



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE N-ACIL HIDRAZONAS  
BIFENÍLICAS COM POTENCIAL ATIVIDADE INIBITÓRIA DE  
PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE (PtpA) DE  
*Mycobacterium tuberculosis***

**JÉSSICA TOIGO**

Florianópolis  
Dezembro/2017

**Jéssica Toigo**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE N-ACIL HIDRAZONAS  
BIFENÍLICAS COM POTENCIAL ATIVIDADE INIBITÓRIA DE  
PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE (PtpA) DE  
*Mycobacterium tuberculosis***

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)

---

**Prof. Dr. Ricardo José Nunes**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Devantier Neuenfeldt**

Florianópolis  
Dezembro/2017

*Aos meus pais e ao meu querido dindo Chico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a todos aqueles que serviram a ciência em tempos passados, em especial a Química, que serviu de inspiração a minha vida nos últimos anos, me fazendo buscar conhecimento, evoluir e entender o funcionamento do mundo. Aos meus pais, Danilo e Célia, por todo amor incondicional, pelo exemplo de perseverança, moral e hombridade. Obrigada por acreditarem em mim, essa conquista também é de vocês. A minha irmã Dali, por ser meu braço direito nesta caminhada, bem como meus padrinhos e demais familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao “mô quiridu” orientador Nunes, ao qual eu tive o prazer de trabalhar durante 3 anos e se tornou um pai para mim. Obrigada pela amizade, pelas risadas e pela orientação. Agradeço a minha “mamis” Patrícia, que além de me adotar, sempre esteve do meu lado, incentivando-me a acreditar no meu potencial. Mesmo longe, você sempre esteve presente!

Aos integrantes do LEAT que me acolheram durante esses anos: maninha Jéss, Lucas, Viu, Venske, Tizzi (agregado) e Luiz, por todo auxílio, chimas, cafés as 9h22min, festinhas de aniver, feirinhas e contribuições com os projetos ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi e demais colaboradores do CEBIME, pela realização dos testes biológicos para este trabalho. Bem como ao Cnpq pelo apoio financeiro e ao departamento de Química e a Central de Análises.

Agradeço também a todos os professores que tive ao longo do curso, por todos o ensinamento e cobranças. Aos colegas de curso e as amigas que fiz durante minha jornada, por todas as angustias de provas, trabalhos, parcerias em laboratório e momentos de descontração.

Ao meu namorado e chaveirinho Luiz, por todo amor, incentivo e compreensão durante este período. Sua presença tornou momentos de tensão e apreensão muito mais fáceis de lidar. Muito obrigada por ser o melhor duo no LOL!

Agradeço imensamente aos meus amigos dos “Bohemios” que estiveram mais presentes, compartilharam momentos tristes e alegrias durante esses anos. Thamara, obrigada, por ter sido meu suporte emocional, por todas as festas, anos de “COMCAP” aposentados, pela paciência (que você não teve HAHA) comigo, por todos os sermões e conselhos. Te admiro e que eu quero levar para a vida. Gili (poderia te considerar

meu “co-co-orientador”?!), obrigada por me guiar em toda minha vida acadêmica e ser o melhor padrinho/veterano que eu poderia querer. Carvin, obrigada por ter sido o maior companheiro durante esses 4 anos. Estivemos juntos desde o início e vamos comemorar juntos essa conquista. Bruno, obrigada pela amizade sincera e verdadeira que construímos, principalmente no último ano. Ana, minha filha/irmã, obrigada por ser essa pessoa incrível. Sei que vou poder sempre contar contigo. Sabrina, meu obrigado não se limita a faculdade, afinal, 17 anos de amizade não é mesmo!? Obrigada pela confiança, pelas milhões de memórias e pela lealdade durante todos esses anos. “Luan, veio de brinde né? “ Como já diria o Gili HAHA. Honorato e Pole, obrigada por todos os momentos, vocês se tornaram pessoas muito especiais na minha graduação. Aos demais amigos que mesmo a quilômetros de distância me acompanharam de alguma forma. Meu muito obrigada, de coração!

As minhas colegas de ap, Amanda e Juliana, por todo companheirismo, pelos momentos felizes na cozinha (e não tão felizes com abacates), pelas promessas de “se eu passar nessa matéria...” e por serem tão presentes. Obrigada, de verdade.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	10
ÍNDICE DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 Química medicinal .....	13
2.2 Tuberculose .....	14
2.2.1 Inibidores de <i>PtpA</i> e <i>PtpB</i> .....	15
2.3 <i>N</i> -acil hidrazonas .....	16
3 OBJETIVOS .....	20
3.1 Objetivo Geral .....	20
3.2 Objetivos específicos .....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Instrumentação e reagentes .....	21
4.2 Procedimento experimental.....	21
4.2.1 Síntese da <i>N</i> -acil hidrazida .....	21
4.2.2 Síntese das <i>N</i> -acil hidrazonas .....	22
4.3.3 Testes biológicos .....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1 Síntese da <i>N</i> -acil hidrazida precursora 2 .....	28
5.2 Síntese das <i>N</i> -acil hidrazonas 4a-k.....	28
5.3 Caracterização dos compostos.....	30
5.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (IR) .....	30

<b>5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) .....</b>	<b>32</b>
<b>5.4 Atividade biológica .....</b>	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>40</b>
<b>8 APÊNDICE .....</b>	<b>I</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inibidores seletivos de PtpA: (a) análogo da roseofilina, (b) análogo da nonilprodigiosina, (c) chalcona naftilica, (d) análogo da estevastelina .....	15
<b>Figura 2.</b> Porcentagem de inibição de PtpA de chalconas bifenílicas.....	16
<b>Figura 3.</b> Principais conformações das <i>N</i> -acil hidrazonas.....	17
<b>Figura 4.</b> Possíveis interações de ligações de hidrogênio das NAHs. ....	17
<b>Figura 5.</b> Espectro na região do IR do composto <b>4b</b> .....	31
<b>Figura 6.</b> Ampliação do espectro na região do IR do composto <b>4b</b> . ....	31
<b>Figura 7.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4b</b> . ....	32
<b>Figura 8.</b> Ampliação do espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4b</b> .....	33
<b>Figura 9.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4b</b> . ....	34
<b>Figura 10.</b> Ampliação do espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4b</b> .....	35
<b>Figura 11.</b> Reação de clivagem do pNPP catalisada pelas enzimas PTPs. ....	36
<b>Figura 12.</b> Espectro na região do IR obtido a partir de Refletância Total Atenuada (ATR) do composto <b>2</b> . ....	I
<b>Figura 13.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4a</b> .....	I
<b>Figura 14.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4a</b> . ....	II
<b>Figura 15.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4b</b> . ....	II
<b>Figura 16.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4b</b> .....	III
<b>Figura 17.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4c</b> .....	III
<b>Figura 18.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4c</b> . ....	IV
<b>Figura 19.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4d</b> . ....	IV
<b>Figura 20.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4d</b> .....	V
<b>Figura 21.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4e</b> .....	V
<b>Figura 22.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4e</b> . ....	VI
<b>Figura 23.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4f</b> . ....	VI
<b>Figura 24.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4f</b> .....	VII
<b>Figura 25.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4g</b> . ....	VII
<b>Figura 26.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4g</b> .....	VIII
<b>Figura 27.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4h</b> . ....	VIII
<b>Figura 28.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4h</b> . ....	IX
<b>Figura 29.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4i</b> .....	IX



<b>Figura 30.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4i</b> .	X
<b>Figura 31.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4j</b> .	X
<b>Figura 32.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4j</b> .	XI
<b>Figura 33.</b> Espectro de NMR de $^1\text{H}$ do composto <b>4k</b> .	XI
<b>Figura 34.</b> Espectro de NMR de $^{13}\text{C}$ do composto <b>4k</b> .	XII
<b>Figura 35.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4a</b> .	XII
<b>Figura 36.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4b</b> .	XIII
<b>Figura 37.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4c</b> .	XIII
<b>Figura 38.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4d</b> .	XIV
<b>Figura 39.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4e</b> .	XIV
<b>Figura 40.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4f</b> .	XV
<b>Figura 41.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4g</b> .	XV
<b>Figura 42.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4h</b> .	XVI
<b>Figura 43.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4i</b> .	XVI
<b>Figura 44.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4j</b> .	XVII
<b>Figura 45.</b> Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto <b>4k</b> .	XVII

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Mecanismo da formação da <i>N</i> -acil hidrazida. ....	18
<b>Esquema 2.</b> Mecanismo de formação das <i>N</i> -acil hidrazonas. ....	19
<b>Esquema 3.</b> Objetivo do projeto: Síntese de <i>N</i> -acil hidrazonas contendo anel bifenil. .....	20

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Síntese da <i>N</i> -acil hidrazida <b>2</b> . ....	28
<b>Tabela 2.</b> Síntese de <i>N</i> -acil hidrazonas <b>4a-k</b> . ....	29
<b>Tabela 3.</b> Atividade de inibição de PtpA (%) na presença de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ das <i>N</i> -acil hidrazonas.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$	Deslocamento químico
ATR	Attenuated Total Reflectance
BK	Bacilo de Koch
CEBIME	Centro de Biologia Molecular e Estrutural
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IR	Infrared
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LABINC	Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia
m	Multiplete
MDR-TB	Multidrug-Resistance Tuberculosis
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAHs	<i>N</i> -Acil Hidrazonas
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p.f	Ponto de fusão
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
<i>p</i> NP	<i>p</i> -nitrofenol
PTPs	Proteínas tirosinas fosfatases
PtpA	Proteína tirosina fosfatase A
PtpB	Proteína tirosina fosfatase B
s	Simpleto
t	tripleto
TB	Tuberculose
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta visível
WHO	World Health Organization

## RESUMO

As *N*-acil hidrazonas (NAHs) são caracterizados por possuir uma estrutura do tipo  $R_1R_2C=NNHCOR_3$  e possuir ampla aplicação biológica e de grande interesse para a química medicinal. Utilizando uma metodologia simples, foram obtidas onze *N*-acil hidrazonas, sendo dessas cinco inéditas, a partir de uma *N*-acil hidrazida bifenílica **2** previamente sintetizada e diferentes aldeídos **3a-k** a fim de serem testadas frente a inibição da proteína tirosina fosfatase A (PtpA) de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Todas as NAHs (**4a-k**) foram obtidas com rendimentos entre 34 e 82% e caracterizadas por IR, NMR de  $^1H$ , NMR de  $^{13}C$  e ponto de fusão. A atividade inibitória foi avaliada *in vitro* frente à PtpA onde as *N*-acil hidrazonas **4c**, **4d**, **4h** e **4k** obtiveram os melhores resultados, inibindo a atividade da proteína de 54,92 a 82,49%. A essas serão determinadas futuramente os valores de  $IC_{50}$ , bem como aplicados os testes de seletividade e mecanismo de ação através de estudos cinéticos.

Palavras-chave: *N*-acil hidrazonas, química medicinal, tuberculose, PtpA

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a química medicinal está intrinsecamente ligada a descoberta de novos fármacos. Através de uma busca racional partindo da escolha do alvo patológico, sob o entendimento do mecanismo de ação do mesmo, pode-se traçar uma estratégia para a criação e desenvolvimento de novos compostos com atividades biológicas.

Em particular, a tuberculose vem sendo alvo de grande preocupação mundial devido ao aparecimento das cepas multirresistentes nos últimos anos. Isso faz com que o tratamento da tuberculose atual se torne menos eficiente, ocasionando em regimes mais longos, emprego de medicamentos de maior toxicidade, que leva, por sua vez, a falta de adesão dos pacientes.

Sendo assim, estratégias alternativas aos fármacos convencionais vêm sendo avaliadas. Estudos recentes apontam que as proteínas fosfatases PtpA e PtpB estão relacionadas com a virulência e a sobrevivência do patógeno no organismo. Busca-se, a partir disso, novos e potenciais compostos inibitórios dessas enzimas que sejam seletivos e tenham baixa toxicidade.

Em relação a busca por novos fármacos, compostos sintéticos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa recentemente mostraram que grupamentos bifenílicos estão envolvidos na inibição dessas proteínas, apresentando resultados promissores. Espera-se que análogos desses compostos devam apresentar a mesma atividade relatada, permitindo fazer a relação estrutura/atividade e podendo gerar compostos ainda mais ativos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Para compreender a importância do desenvolvimento de novas moléculas para fins farmacológicos e quais são as relações estrutura/atividade que podem ser feitas, alguns tópicos devem ser elucidados. Uma breve revisão de literatura é apresentada a seguir abordando tópicos de como a química medicinal se relaciona com a busca de tratamentos para diversas doenças; a problemática envolvendo a tuberculose e a procura por tratamentos com diferentes mecanismos de ação; e quais são as estruturas químicas que possuem grande potencial farmacológico.

### 2.1 Química medicinal

A química medicinal, segundo a definição da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), consiste na busca de novas substâncias químicas bioativas a fim de se tornarem novos fármacos, bem como o estudo de fármacos já existentes, suas propriedades farmacológicas e a relação entre sua estrutura e atividade.<sup>1</sup>

Na sua maioria, os fármacos atuam na inibição ou aceleração de algum processo biológico no organismo, esse muitas vezes controlado pela ação de macromoléculas, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. A compreensão detalhada da estrutura e função dos alvos moleculares que estão presentes no corpo humano vêm sendo a chave para o desenvolvimento de compostos que possuam a atividade farmacológica desejada.<sup>2, 3</sup>

Para isso, a química medicinal se tornou disciplina híbrida operando conjuntamente com diferentes especialidades como bioquímica, clínica médica, físico-química, fisiologia, patologia, química orgânica, química quântica, etc., dentro dos aspectos trans- multi- e interdisciplinar, onde todas as partes são igualmente fundamentais para o desenvolvimento de fármacos.<sup>3</sup>

Atualmente as doenças negligenciadas, como a tuberculose, requerem uma atenção especial, uma vez que apresentam indicadores de mortalidade preocupantes, tratamentos insuficientes e baixos investimentos em pesquisa.<sup>4</sup>

## 2.2 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma infecção contagiosa, transmitida pelo ar, causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) ou Bacilo de Koch (BK) e que geralmente ataca os pulmões. Suas principais características estão relacionadas ao sistema respiratório incluindo tosse crônica com catarro ou sangue, todavia nem sempre esses sintomas são manifestados.<sup>5-7</sup>

Apesar de existirem diversos tratamentos da tuberculose, a Organização Mundial da Saúde (WHO) registrou somente no ano de 2015 mais de 10 milhões de novos casos de TB, e quase 2 milhões de mortes.<sup>6</sup> A estimativa é que nos próximos dez anos um terço da população mundial esteja infectada pela bactéria, podendo haver mais de 30 milhões de mortes.<sup>8</sup>

Os fatores que contribuem para que a TB seja ainda considerada um problema de saúde pública global estão atrelados principalmente a falta de adesão dos pacientes ao tratamento. A longa duração terapêutica (cerca de 6 a 9 meses), combinada com os diversos efeitos colaterais causados pelos coquetéis de medicamentos utilizados (entre eles a isoniazida e a rifampicina), são algumas das razões desse abandono.<sup>8,9</sup>

Outro problema relacionado é a não eliminação total da bactéria no organismo causada pelo aparecimento de cepas de TB multirresistentes (MDR – TB, *Multidrug – resistant Tuberculosis*). Mesmo após a fagocitose, o invasor pode sobreviver dentro dos macrófagos, permanecendo adormecido no organismo por vários anos.<sup>10</sup>

A partir do sequenciamento do DNA genômico da Mtb, se constatou que processos metabólicos intracelulares de sinalização estavam relacionados com a invasão celular no hospedeiro e a sobrevivência do mesmo.<sup>10</sup>

Uma das estratégias que vem sendo utilizada para o planejamento de novas moléculas é interferir no processo de sinalização celular, agindo de forma diferente dos fármacos conhecidos atualmente, podendo ser eficaz na inibição de enzimas chaves para a intercomunicação da bactéria e do macrófago, como por exemplo as proteínas tirosinas fosfatases A (PtpA) e B (PtpB).<sup>10</sup>

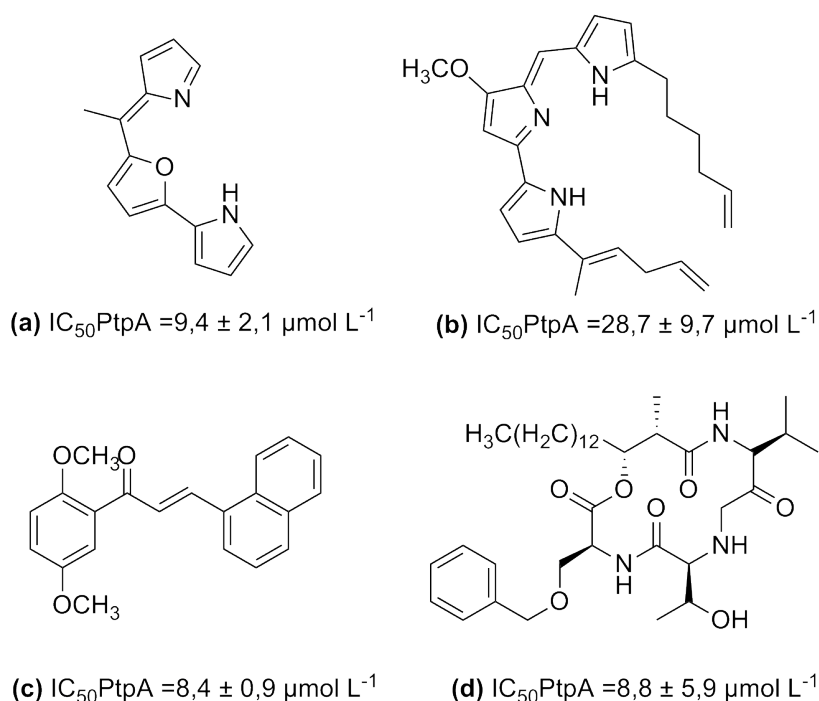
### 2.2.1 Inibidores de PtpA e PtpB

As proteínas do tipo tirosinas fosfatases (PTPs) fazem parte de uma família de enzimas responsáveis pela hidrólise do fosfato ligado aos resíduos de tirosina em proteínas. Essas estão intrinsecamente envolvidas em uma série de funções celulares tais como crescimento, metabolismo, resposta imune, entre outras. Além disso, contribuem para o desenvolvimento de várias patologias humanas bacterianas que implicam na virulência do patógeno.<sup>11, 12</sup>

Pôde-se identificar no genoma da Mtb duas proteínas (PtpA e PtpB) responsáveis por interferir na sinalização celular do macrófago do hospedeiro. Elas agredem a defesa do mesmo mediada pela fosforilação/desfosforilação das fosfotirosinas produzidas. Esses eventos celulares são rigorosamente controlados ao nível da transdução de sinal e são críticos para a depuração bem-sucedida de agentes patogênicos do macrófago.<sup>11,13</sup>

Os primeiros inibidores de PtpA relatados na literatura identificaram análogos dos produtos naturais roseofilinas, prodigiosinas e estevalinas,<sup>13</sup> bem como chalconas sintéticas,<sup>14</sup> com valores de IC<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% da enzima) entre 8,4 e 28,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , muitos deles apresentando grupamentos bi aromáticos (Figura 1).

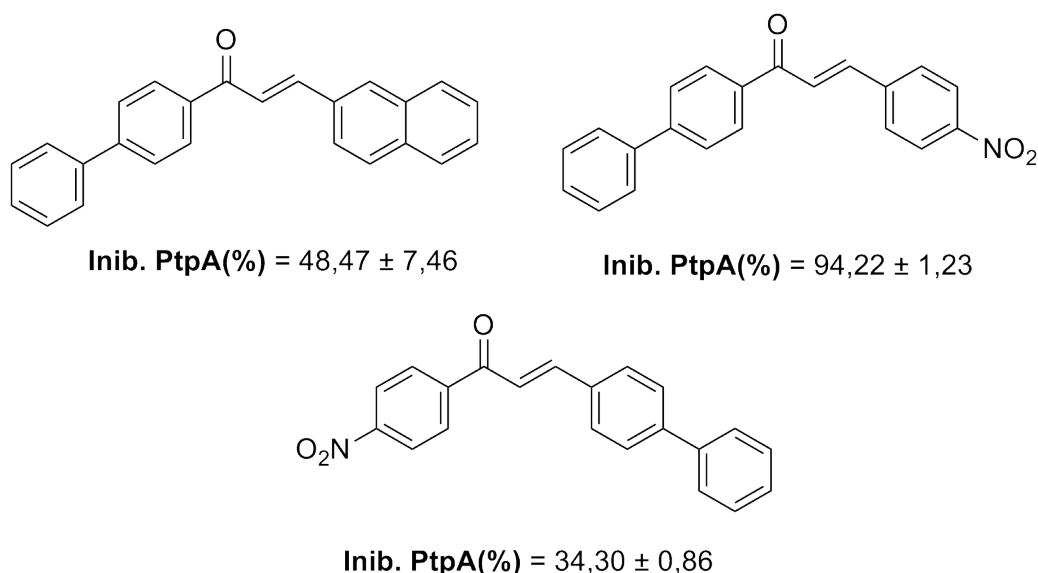
**Figura 1.** Inibidores seletivos de PtpA: (a) análogo da roseofilina, (b) análogo da nonilprodigiosina, (c) chalcona naftilica, (d) análogo da estevastelina





Recentemente, foi observado em nosso grupo de pesquisa que a atividade inibitória de chalconas contendo anel bifenílico frente as proteínas PtpA de Mtb, apresentando boas porcentagens de inibição (Figura 2).<sup>15</sup>

**Figura 2.** Porcentagem de inibição de PtpA de chalconas bifenílicas.



Sendo assim, a presença de anéis hidrofóbicos vem sendo alvo de estudos de correlação estrutura/atividade, mostrando que esses grupos podem formar uma interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  com resíduos de aminoácidos que também contenham anéis aromáticos como, por exemplo, o triptofano de PtpA.<sup>14</sup> Neste caso, o anel bifenílico possui uma maior flexibilidade de rotação em relação ao naftila, podendo aumentar a eficácia na interação com o biorreceptor, levando a uma molécula mais ativa.<sup>15</sup>

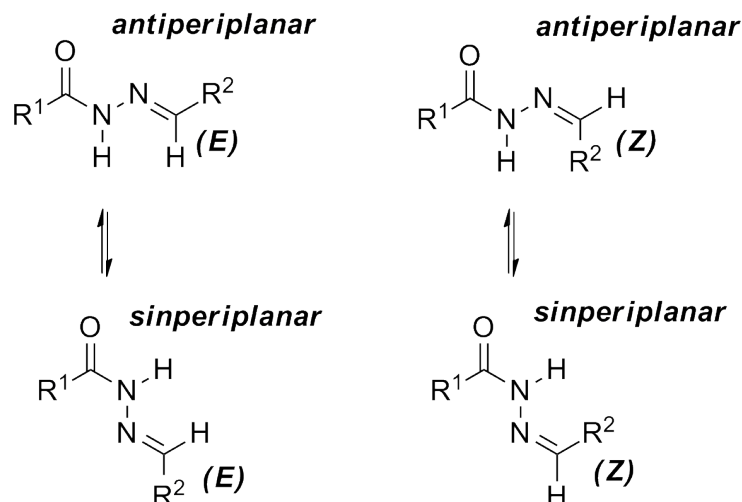
Ainda, foi constatado que a presença desses grupamentos próximos a átomos que permitam fazer ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos polares da proteína se mostram essenciais na inibição da enzima PtpA,<sup>16</sup> sendo entre esses, a classe das *N*-acil hidrazonas.

### 2.3 *N*-acil hidrazonas

As *N*-acil hidrazonas (NAHs) fazem parte de uma importante classe de compostos caracterizados por uma estrutura do tipo  $R_1R_2C=NNHCOR_3$ . Esses podem

existir como estereoisômeros *E* e *Z* da ligação dupla C=N e com as conformações *sin*/*antiperiplanar* sob a ligação amida CO-NH (Figura 3).<sup>17</sup>

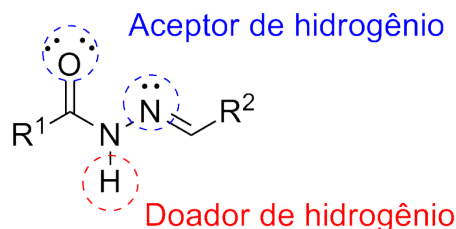
**Figura 3.** Principais conformações das *N*-acil hidrazonas.



A classe das NAHs se mostra muito privilegiada, tanto no ponto de vista da química orgânica sintética,<sup>18</sup> como na formação de heterocíclicos, e especialmente na química medicinal.<sup>19</sup> Isso se deve a diversidade conformacional e estrutural que essas apresentam, permitindo que, por mudanças químicas sutis e simples, resultem em diferentes aplicações terapêuticas, tais como antibactericida, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiprotozoaria, analgésica entre outras<sup>20-23</sup>.

Ainda, a fusão entre subunidades de imina e amida em sua estrutura permite realizar interações através de ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos de proteínas<sup>17</sup> (Figura 4).

**Figura 4.** Possíveis interações de ligações de hidrogênio das NAHs.

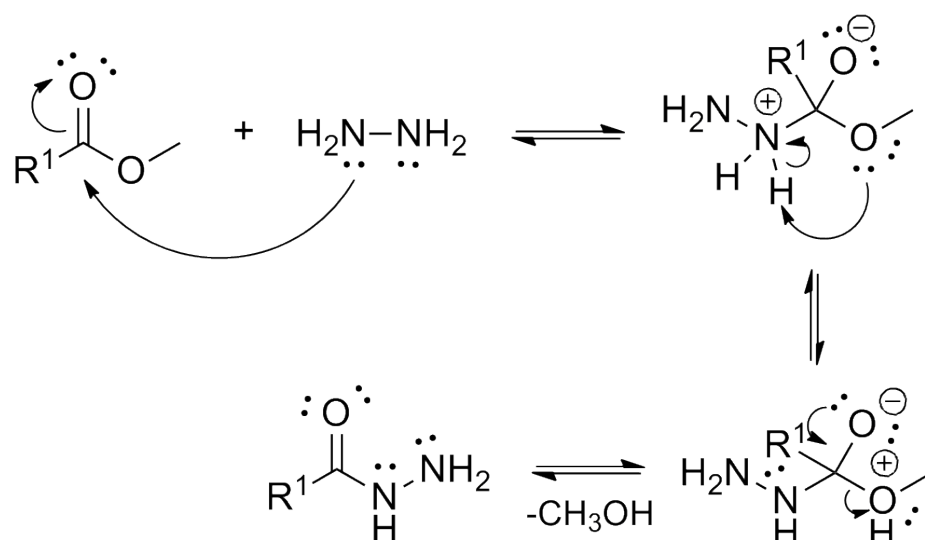


Uma das metodologias mais amplamente empregadas na literatura para a síntese das *N*-acil hidrazonas é a partir das *N*-acil hidrazidas. Essas são facilmente

formadas utilizando um éster e hidrazina hidratada ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). Comumente se utiliza o solvente correspondente ao álcool do éster reagente, evitando assim a transesterificação do mesmo.<sup>21</sup>

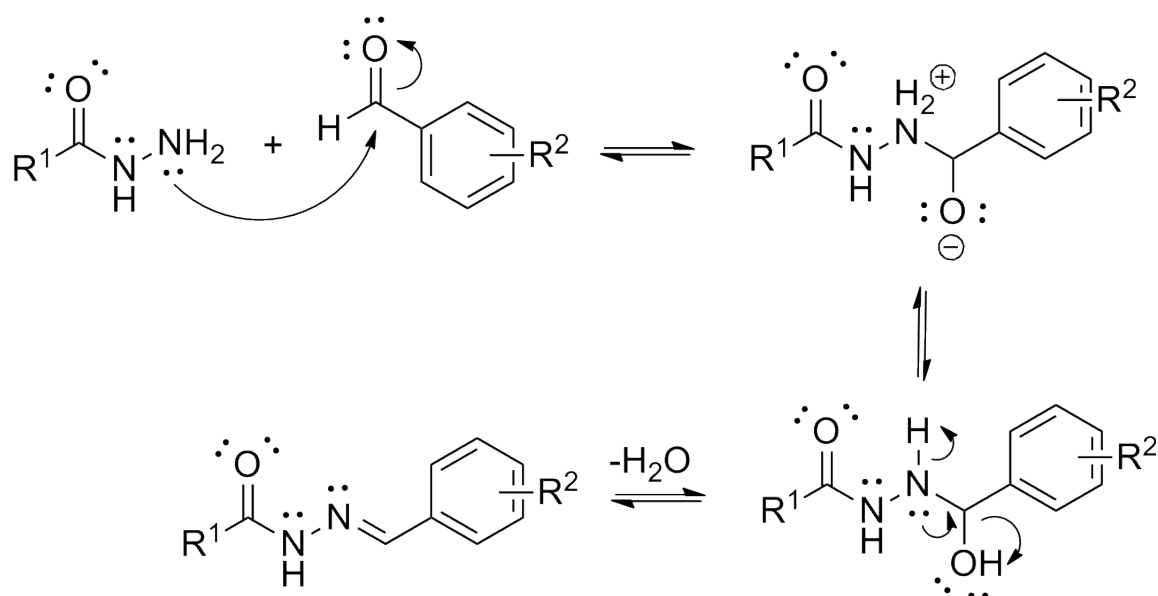
O mecanismo provável para a formação da *N*-acil hidrazida se inicia com o ataque nucleofílico do nitrogênio da hidrazina ao carbono carbonílico do éster formando um intermediário tetraédrico. Esse por sua vez, leva a eliminação de uma molécula de metanol, através de uma série de etapas de prototropismo, favorecidas pela regeneração da ligação carbonílica resultando na formação da hidrazida (Esquema 1).

**Esquema 1.** Mecanismo da formação da *N*-acil hidrazida.



Posteriormente, as *N*-acil hidrazonas são formadas através de uma reação de condensação da *N*-acil hidrazida apropriada e um aldeído, utilizando etanol como solvente. Os grupamentos adjacentes à carbonila do aldeído podem favorecer ou não a formação do produto conforme a influência desses sobre a eletrofilicidade do mesmo.<sup>24</sup>

O mecanismo mais aceito para essa síntese se inicia com o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da *N*-acil hidrazida à carbonila do aldeído, levando à formação de um intermediário tetraédrico. O equilíbrio gerado leva a eliminação de uma molécula de água e que resultam nas *N*-acil hidrazonas desejadas. (Esquema 2).

**Esquema 2.** Mecanismo de formação das *N*-acil hidrazonas.

Tendo em vista o potencial inibitório das NAHs, bem como a importância do anel bifenílico para a inibição da PtpA, a ideia deste trabalho está na síntese de diferentes *N*-acil hidrazonas contendo o anel bifenílico em sua estrutura, a fim de encontrar inibidores mais potentes e seletivos para essa enzima.

### 3 OBJETIVOS

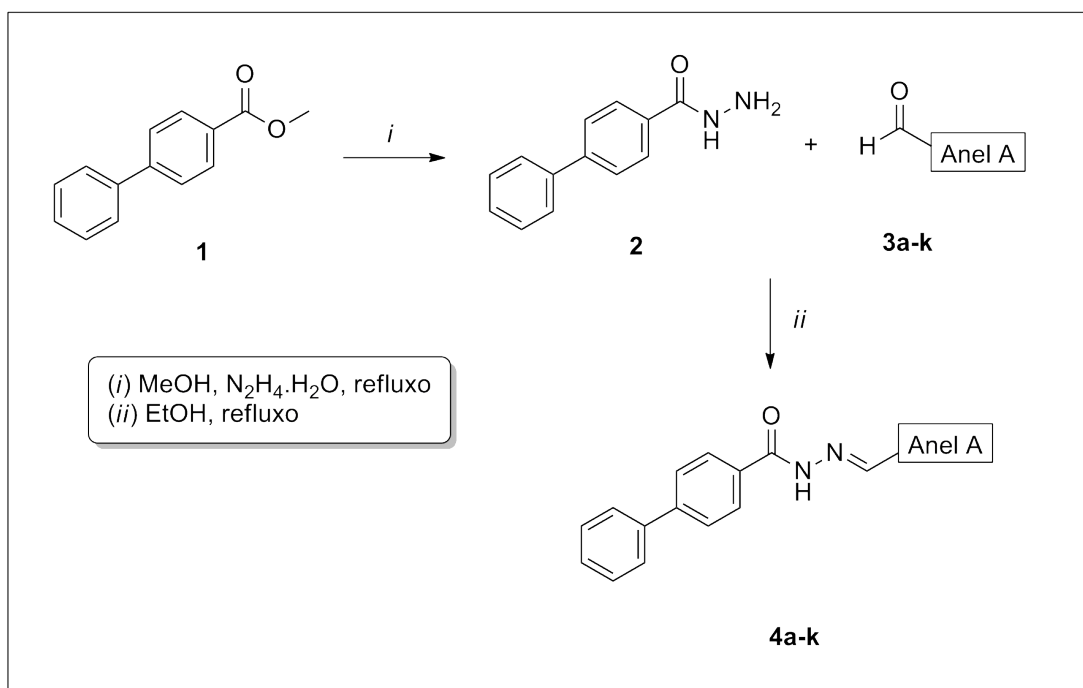
#### 3.1 Objetivo Geral

Promover a síntese de *N*-acil hidrazonas bifenílicas a fim de avaliar sua atividade inibitória frente à PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obter e purificar a *N*-acil hidrazida precursora **2** ([1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida).
- Sintetizar e purificar as *N*-acil hidrazonas propostas com diferentes aldeídos (Esquema 3).
- Caracterizar os compostos obtidos, utilizando da leitura do ponto de fusão, espectroscopia na região do IR, espectroscopia de NMR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .
- Avaliar o potencial inibitório das *N*-acil hidrazonas bifenílicas obtidas frente à PtpA de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Discutir a relação entre a estrutura química e a atividade biológica.

**Esquema 3.** Objetivo do projeto: Síntese de *N*-acil hidrazonas contendo anel bifenílico.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Instrumentação e reagentes

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de  $^1\text{H}$  (200 e 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (50 e 100MHz) foram obtidos em um espectrômetro BRUKER AC-200F e BRUKER Avance Drx, na Central de Análises do Departamento de Química - UFSC. Para esta análise utilizou-se o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) como solvente, contendo tetrametilsilano como padrão interno ( $\delta = 0,00$  ppm). Os espectros na região do infravermelho ( $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ ) foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), no Departamento de Química – UFSC e um espectrofotômetro BRUKER Alpha, na Central de Análises do Departamento de Química - UFSC. As amostras sólidas foram analisadas a partir de Refletância Total Atenuada (ATR) e em pastilha de KBr em grau espectroscópico. O ponto de fusão não corrigido de todos os compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MGAPF-301 da Microquímica Equipamento Ltda. Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia de camada delgada (TLC) em placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck utilizando UV como revelador.

Foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: 4-fenilbenzoato de metila (Aldrich), hidrazina hidratada 50-60% (Aldrich), metanol PA (CRQ), etanol PA (Dinâmica), acetato de etila PA (Dinâmica), dimetilsulfóxido deuterado (Cambridge ICT), peneira molecular 4 Å (Carlo Erba Reagenti), bem como demais aldeídos (Aldrich), sendo todos obtidos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia.

### 4.2 Procedimento experimental

#### 4.2.1 Síntese da *N-acil hidrazida*

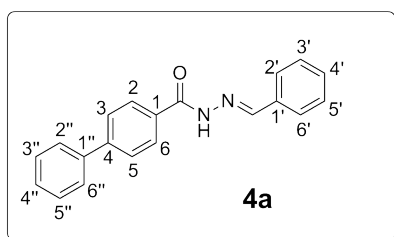
Em um balão de 50mL foram adicionados 3 mmol do éster bifenílico **1**, 2 mL de hidrazina hidratada 50-60% (aproximadamente 3 mmol) e 20 mL de metanol. A reação ficou em refluxo durante 6 horas, sob agitação magnética e depois mantida à temperatura ambiente *overnight*. O sólido branco formado foi filtrado a vácuo, não

havendo necessidade de recristalização, obtendo por fim um rendimento de 72%; p.f. 180,4-182,8.

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3336 (N-H<sub>2</sub>), 3273 (N-H), 1610 (C=O), 849 (N-N).

#### 4.2.2 Síntese das *N*-acil hidrazonas

Para a preparação das *N*-acil hidrazonas (**4a-k**) se adicionou em um balão de 50 mL 1mmol da *N*-acil hidrazida **2**, sintetizada anteriormente, 1 mmol do respectivo benzaldeído substituído (**3a-k**) e 20 mL de etanol. A reação ficou em refluxo por 3 horas e agitação magnética constante. Após o resfriamento, o produto bruto foi filtrado e lavado com etanol gelado. Todas as *N*-acil hidrazonas foram obtidas com o mesmo procedimento experimental, e quando necessário, o produto foi recristalizado com etanol e acetato de etila a quente.



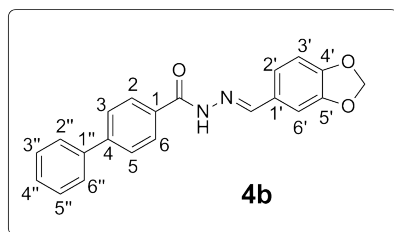
##### (*E*)-*N'*-benzilideno-[1,1'-bifenil]-4-

**carbohidrazida**, sólido branco; C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>ON<sub>2</sub>; rendimento 82%, p.f. 238,2-240,1 °C ; <sup>1</sup>H NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,41 - 7,55 (m, 6H, H3'', H4'', H5'', H3', H4' e H5')\*, 7,75 - 7,86 (m, 6H, H2'', H6'', H3, H5, H2' e H6')\*, 8,03 (d, 2H, *J*=8,04 Hz, H2 e H6)\*, 8,49 (s, 1H, -CONH), 11,91 (s, 1H, N=CH).

<sup>13</sup>C NMR (50MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 126,6 – 143,2 (C anéis aromáticos), 147,7 (C=N), 162,7 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3202 (N-H), 3053 (C-H alceno), 3028 (C-H aromático), 1634 (C=O).

\*H intercambiáveis



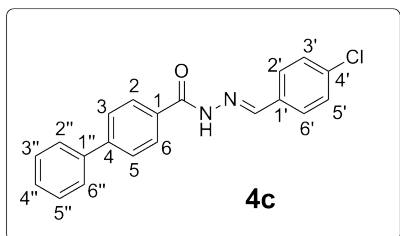
##### (*E*)-*N'*-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-

**[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco; C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>; rendimento 52%, p.f. 219,8-221,1; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 6,10 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-O-) 7,00 (d, 1H, *J*=8,07 Hz, H3'), 7,18 (d, 1H, *J*=8,07 Hz, H2'), 7,33 (s, 1H, H6'), 7,41 (dd, 1H, *J*=7,09 Hz, H4''), 7,50 (dd, 2H, *J*=7,34 Hz, H3'' e H5'')\* 7,75 (d, 2H, *J*=7,58 Hz, H3 e H5)\*, 7,82 (d, 2H, *J*=8,07 Hz, H2'' e H6'')\*, 8,02 (d, 2H, *J*=8,07 Hz, H2 e H6)\*, 8,41 (s, 1H, -CONH), 11,85 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 101,5 (-O-CH<sub>2</sub>-O-), 105,1 – 147,9 (C anéis aromáticos), 149,0 (C=N), 162,6 (C=O)

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3216 (N-H), 3053 (C-H alceno), 3029 (C-H aromático), 1644 (C=O), 1260 e 1038 (C-O).

\*H intercambiáveis

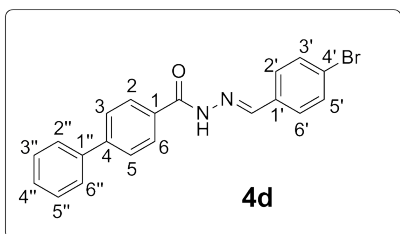


**(E)-N'-(4-clorobenzilideno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco; C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>ON<sub>2</sub>Cl; rendimento 64%, p.f. 255,8-257,1;  $^1\text{H}$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,42 - 7,56 (m, 5H, H3'', H4'', H5'', H3' e H5') \*, 7,75 - 7,86 (m, 6H, H2'', H6'', H3, H5, H2' e H6') \*, 8,03 (d, 2H,  $J=8,02$  Hz, H2 e H6) \*, 8,48 (s, 1H, -CONH), 11,99 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 126,6 – 143,3 (C anéis aromáticos), 146,4 (C=N), 162,8 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3282 (N-H), 3061 (C-H alceno), 3039 (C-H aromático), 1652 (C=O).

\*H intercambiáveis

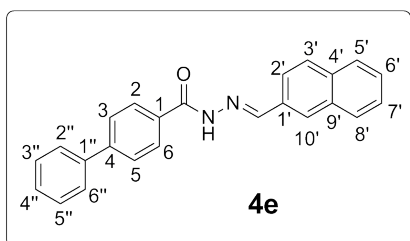


**(E)-N'-(4-bromobenzilideno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco; C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>ON<sub>2</sub>Br; rendimento 34%, p.f. 260,7-261,9;  $^1\text{H}$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,42 - 7,55 (m, 3H, H3'', H4'' e H5'') \*, 7,68 - 7,86 (m, 8H, H2'', H6'', H3, H5, H2', H6', H3' e H5') \*, 8,03 (d, 2H,  $J=8,08$  Hz, H2 e H6) \*, 8,46 (s, 1H, -CONH), 11,98 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 123,2 – 146,5 (C anéis aromáticos), 146,5 (C=N), 162,8 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3282 (N-H), 3059 (C-H alceno), 3039 (C-H aromático), 1652 (C=O).

\*H intercambiáveis



**(E)-N'-(naftalen-2-ilmetileno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco; C<sub>24</sub>H<sub>18</sub>ON<sub>2</sub>; rendimento 76%, p.f. 251,2-252,8;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,41 (dd, 1H,  $J=7,34$ Hz,

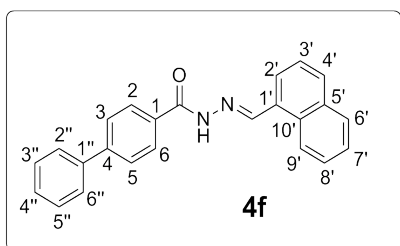


H4''), 7,52 (dd, 2H,  $J=7,83\text{Hz}$ , H3'' e H5'') \*, 7,58 (dd, 2H, H6' e H7') \*, 7,77 (d, 2H,  $J=7,34\text{Hz}$ , H2'' e H3'') \*, 7,86 (d, 2H,  $J=8,31\text{Hz}$ , H3 e H5) \*, 7,95 – 8,07 (m, 6H, H2, H6, H2', H3', H5' e H8') \*, 8,17 (s, 1H, H10') \*, 8,65 (s, 1H, -CONH), 12,03 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 122,6 – 143,3 (C anéis aromáticos), 147,7 (C=N), 162,7 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3241 (N-H), 3053 (C-H alceno), 3033 (C-H aromático), 1648 (C=O).

\*H intercambiáveis



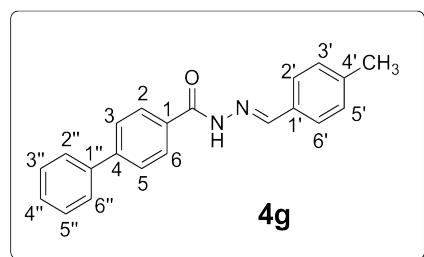
**(E)-N'-(naftalen-1-ilmetileno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco;  $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ON}_2$ ; rendimento 64%, p.f. 224,9-226,0;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,44 (dd, 1H,  $J=7,34\text{Hz}$ , H4''), 7,53 (dd, 2H,  $J=7,82\text{Hz}$ , H3'' e H5''), 7,61 –

7,66 (m, 2H, H7' e H8') \*, 7,70 (dd, 1H,  $J=7,58\text{Hz}$ , H3') \*, 7,79 (d, 2H,  $J=7,09\text{Hz}$ , H2'' e H6'')\*, 7,89 (d, 2H,  $J=8,07\text{Hz}$ , H3 e H5) \*, 7,97 (d, 1H,  $J=7,09\text{Hz}$ , H9'), 8,05 (m, 2H, H4' e H6')\*, 8,10 (d, 2H,  $J=8,31\text{Hz}$ , H2 e H6)\*, 8,91 (d,  $J=8,56\text{Hz}$ , 1H, H2'')\*, 9,16 (s, 1H, -CONH), 12,03 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 124,4 – 143,7 (C anéis aromáticos), 148,0 (C=N), 163,3 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3216 (N-H), 3055 (C-H alceno), 3033 (C-H aromático), 1652 (C=O).

\*H intercambiáveis



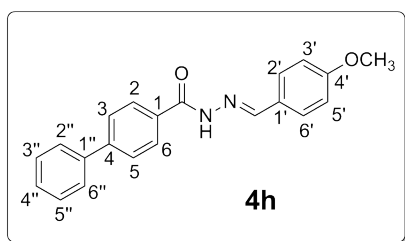
**(E)-N'-(4-metilbenzilideno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco;  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ON}_2$ ; rendimento 67%, p.f. 222,2-223,1;  $^1\text{H}$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 2,35 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7,28 (d, 2H,  $J=7,58\text{ Hz}$ , H3' e H5')\* 7,39 - 7,54 (m, 3H,

H3'', H4'' e H5'')\*, 7,65 (d, 2H,  $J=7,58\text{ Hz}$ , H2'' e H6'')\*, 7,74 - 7,85 (m, 4H, H3, H5, H2' e H6')\*, 8,04 (d, 2H,  $J=8,07\text{ Hz}$ , H2 e H6)\*, 8,46 (s, 1H, -CONH), 11,86 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta/\text{ppm}$ : 21,0 (-CH<sub>3</sub>), 126,6 – 143,2 (C anéis aromáticos), 147,8 (C=N), 162,6 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3237 (N-H), 3057 (C-H alceno), 3029 (C-H aromático), 1650 (C=O).

\*H intercambiáveis



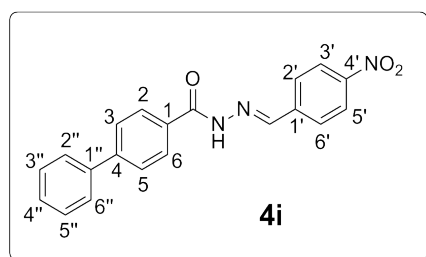
**(E)-N'-(4-metoxibenzilideno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco;  $C_{21}H_{18}O_2N_2$ ; rendimento 66%, p.f. 231,2-233,0;  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 3,82 (s, 3H,  $-OCH_3$ ), 7,04 (d, 2H,  $J=8,56$  Hz,  $H_{3'}$  e  $H_{5'}$ )\*, 7,41 (dd, 1H,  $H_{4''}$ ,

$J=7,04$ Hz), 7,51 (dd, 2H,  $H_{3''}$  e  $H_{5''}$ ,  $J=7,34$ Hz), 7,69 (d, 2H,  $J=8,80$ Hz,  $H_{2''}$  e  $H_{6''}$ ), 7,76 (d, 2H,  $J=7,58$  Hz,  $H_3$  e  $H_5$ ), 7,84 (d, 2H,  $J=8,31$ Hz,  $H_{2'}$  e  $H_{6'}$ ), 8,02 (d, 2H,  $J=8,31$ Hz,  $H_2$  e  $H_6$ ), 8,42 (s, 1H,  $-CONH$ ), 11,79 (s, 1H,  $N=CH$ ).

$^{13}C$  NMR (100MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 55,20 ( $OCH_3$ ), 114,35 – 143,05 (C anéis aromáticos), 147,56 ( $C=N$ ), 160,74 (C anel aromático  $C_{4'}$ ), 162,43 ( $C=O$ ).

IV  $\lambda_{max}/cm^{-1}$ : 3269 (N-H), 3008 (C-H aromático), 1652 ( $C=O$ ).

\*H intercambiáveis



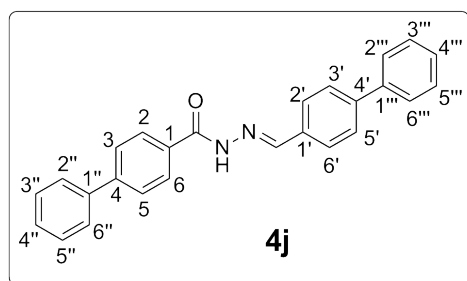
**(E)-N'-(4-nitrobenzilideno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco;  $C_{20}H_{15}O_3N_3$ ; rendimento 45%, p.f. 217,8-219,4;  $^1H$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,39 - 7,55 (m, 3H,  $H_{3''}$ ,  $H_{4''}$  e  $H_{5''}$ )\*, 7,64 - 7,87 (m, 6H,  $H_{2''}$ ,  $H_{6''}$ ,  $H_3$ ,  $H_5$ ,  $H_{2'}$  e  $H_{6'}$ )\*, 8,04-8,18 (m, 4H,  $H_2$ ,  $H_6$ ,  $H_{3'}$  e  $H_{5'}$ )\*,

8,91 (s, 1H,  $-CONH$ ), 12,26 (s, 1H,  $N=CH$ ).

$^{13}C$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 124,4 – 143,4 (C anéis aromáticos), 148,1 ( $C=N$ ), 162,8 ( $C=O$ )

IV  $\lambda_{max}/cm^{-1}$ : 3214 (N-H), 3068 (C-H alceno), 3033 (C-H aromático), 1644 ( $C=O$ ).

\*H intercambiáveis



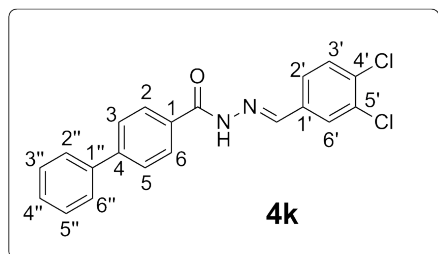
**(E)-N'-([1,1'-bifenil]-4-ilmetileno)-[1,1'-bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco;  $C_{26}H_{20}ON_2$ ; rendimento 42%, p.f. 296,3-297,9;  $^1H$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,38 - 7,54 (m, 6H,  $H_{3''}$ ,  $H_{4''}$ ,  $H_{5''}$ ,  $H_{3'''}$ ,  $H_{4'''}$  e  $H_{5'''}$ )\*, 7,73 - 7,80 (m, 6H,  $H_{2''}$ ,  $H_{6''}$ ,  $H_{3'}$ ,  $H_{5'}$ ,  $H_{2'''}$  e  $H_{6'''}$ )\*, 7,84 –

7,86 (m, 4H,  $H_3$ ,  $H_5$ ,  $H_{2'}$  e  $H_{6'}$ )\*, 8,04 (d, 2H,  $J=8,31$  Hz,  $H_2$  e  $H_6$ )\*, 8,53 (s, 1H,  $-CONH$ ), 11,97 (s, 1H,  $N=CH$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 126,6 – 143,2 (C anéis aromáticos), 147,3 (C=N), 162,7 (C=O)

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3280 (N-H), 3057 (C-H alceno), 3035 (C-H aromático), 1654 (C=O).

\*H intercambiáveis



**(E)-N'-(3,4-diclorobenzilideno)-[1,1'-**

**bifenil]-4-carbohidrazida**, sólido branco;

$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ON}_2\text{Cl}_2$ ; rendimento 74%, p.f. 225,9-227,6;

$^1\text{H}$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 7,42 - 7,55 (m, 3H, H3'', H4'' e H5'') \*, 7,74 - 7,86 (m, 6H, H2'', H6'', H3, H5, H2' e H3') \*, 7,98 – 8,05 (m, 3H, H6',

H2 e H6)\*, 8,45 (s, 1H, -CONH), 12,12 (s, 1H, N=CH).

$^{13}\text{C}$  NMR (200MHz, DMSO)  $\delta$ /ppm: 126,8 – 143,4 (C anéis aromáticos), 144,9 (C=N), 162,8 (C=O).

IV  $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3222 (N-H), 3057 (C-H alceno), 3031 (C-H aromático), 1650 (C=O).

\*H intercambiáveis

#### 4.3.3 Testes biológicos

Os testes biológicos de triagem da atividade residual da enzima proteína tirosina fosfatase A de *Mycobacterium tuberculosis* foram realizados no Centro de Biologia Molecular e Estrutural (CEBIME) da Universidade Federal de Santa Catarina, coordenado pelo Prof. Dr. Hernán Terenzi.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços contendo 5  $\mu\text{L}$  de composto diluído em DMSO a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  (concentração final de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), 169  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q, 20  $\mu\text{L}$  de tampão imidazol 0,2  $\text{mol L}^{-1}$  pH=7 (concentração final de 20  $\text{mmol L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de proteína a 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (concentração final de 50  $\text{nmol L}^{-1}$ ) e 5  $\mu\text{L}$  de pNPP, que é o substrato sintético de fosfatase.

A absorbância foi medida a cada 1 minuto, durante 11 ciclos no comprimento de 405 nm em espectrofotômetro UV-Vis para placas de ELISA (TECAN Magellan Infinite M200) a 25 °C. Controles negativos foram feitos na ausência de enzima e compostos, e controles positivos na presença de enzima e dimetilsulfóxido (DMSO) 100% no lugar do composto. O percentual de atividade residual foi calculado pela

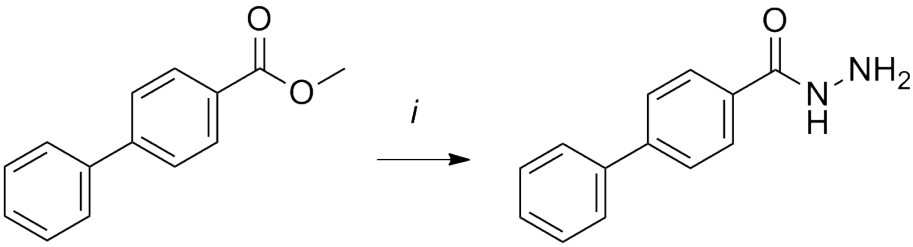
diferença de absorvância entre o tempo de 7 e 2 minutos, obtido pela média de três experimentos feitos em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese da *N*-acil hidrazida precursora **2**

A síntese da *N*-acil hidrazida **2** se deu utilizando a metodologia já descrita anteriormente. A utilização do metanol como solvente evita a reação em paralelo de transesterificação com o éster metílico **1**, favorecendo a formação do produto. O mesmo já foi reportado na literatura<sup>25</sup> e está sendo apresentada na Tabela 1, conjuntamente com seu respectivo ponto de fusão e rendimento.

**Tabela 1.** Síntese da *N*-acil hidrazida **2**.

	
<b>1</b>	<b>2</b>
Rendimento(%)	p.f. (°C)
72	180,4-182,8

(i) MeOH, N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, refluxo, agitação magnética.

Sendo seu ponto de fusão reportado de 182 a 183°C,<sup>26</sup> pode-se afirmar que foi possível obter o precursor com um rendimento com um bom grau de pureza, não havendo necessidade de purificação. Este então foi caracterizado por espectroscopia na região do IR (espectro inserido na seção Apêndice), onde se pode identificar os estiramentos referentes ao NH e NH<sub>2</sub>, bem como o estiramento referente a carbonila de *N*-acil hidrazidas em 1610 cm<sup>-1</sup>.

### 5.2 Síntese das *N*-acil hidrazonas **4a-k**

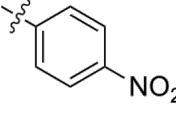
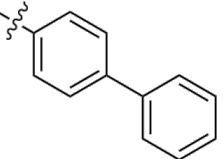
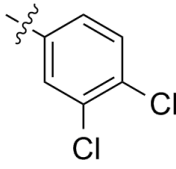
Foram sintetizadas onze *N*-acil hidrazonas das quais cinco são inéditas (**4b**, **4f**, **4g**, **4j**, **4k**) e os compostos **4a**, **4c**, **4d**, **4e**, **4h**, **4i** já foram reportados em literatura.<sup>26-</sup>

<sup>29</sup> Para o Anel A foram variados diferentes substituintes escolhidos de acordo com a árvore de Topliss<sup>30</sup> conjuntamente com o que já foi relatado em trabalhos anteriores.<sup>14,15,32</sup> Os compostos estão apresentados na Tabela 2, incluindo seus respectivos pontos de fusão experimentais e rendimentos.

**Tabela 2.** Síntese de *N*-acil hidrazonas **4a-k**.

2	3a-k	4a-k	
Compostos	Anel A	Rendimento(%)	p.f. (°C)
<b>4a</b>		82	238,2-240,1
<b>4b</b>		52	219,8-221,1
<b>4c</b>		64	255,8-257,1*
<b>4d</b>		34	260,7-261,9
<b>4e</b>		76	251,2-252,8
<b>4f</b>		64	224,9-226,0
<b>4g</b>		67	222,2-223,1
<b>4h</b>		66	231,2-233,0**

**Tabela 2.** Síntese de N-acil hidrazonas **4a-k** (continuação).

<b>4i</b>		45	217,8-219,4
<b>4j</b>		42	296,3-297,9
<b>4k</b>		74	225,9-227,6

(ii) EtOH, refluxo, agitação magnética.

\*Ponto de fusão teórico 261-262°C

\*\*Ponto de fusão teórico 204-205°C

Conforme a tabela, é possível observar a metodologia empregada levou a rendimentos considerados bons, sendo condizentes com a literatura,<sup>21</sup> com exceção dos compostos **4d**, **4i** e **4j**, possivelmente causados por perdas em processos de purificação.

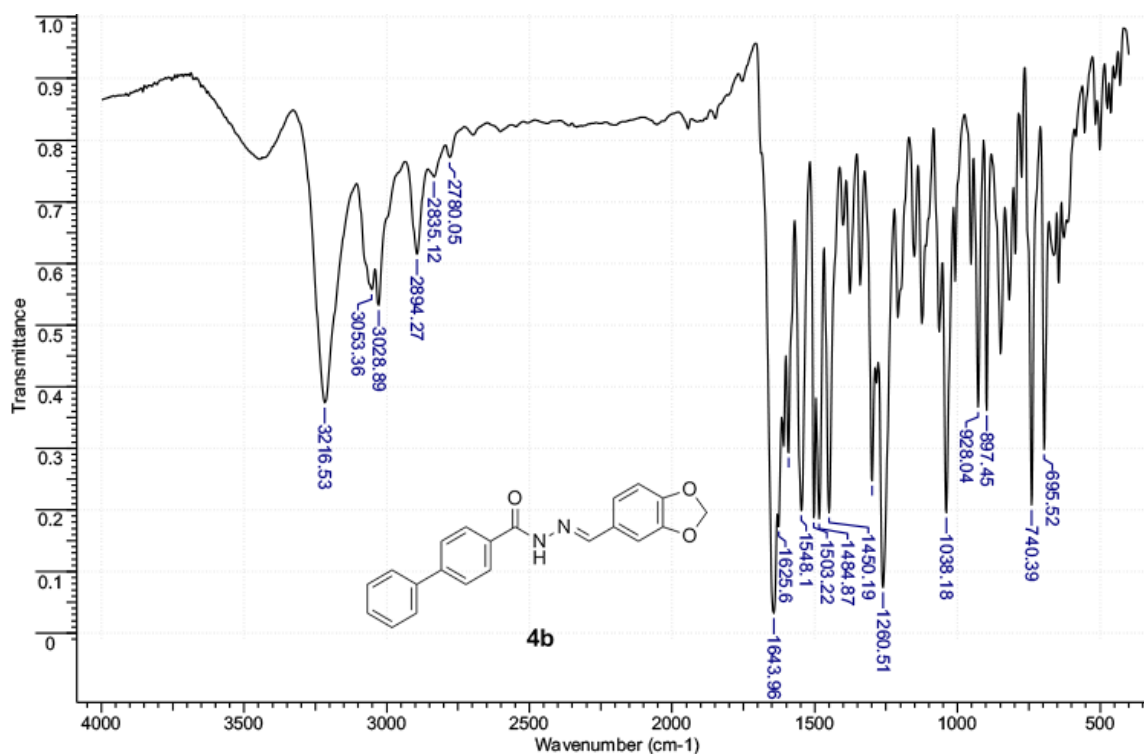
De todas as *N*-acil hidrazonas apenas três (**4d**, **4f** e **4i**) necessitaram de purificação por recristalização utilizando uma mistura de etanol e acetato de etila.

### 5.3 Caracterização dos compostos

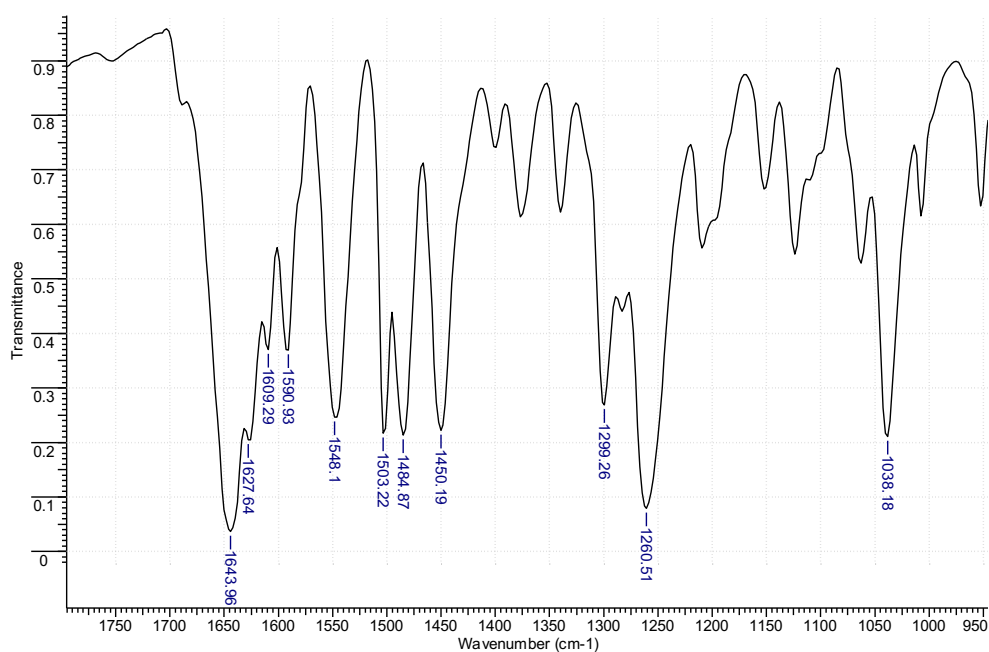
#### 5.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (IR)

Os compostos foram caracterizados inicialmente utilizando espectroscopia na região do infravermelho em pastilha de KBr, entre 4000 e 450 cm<sup>-1</sup>, parâmetros já descritos anteriormente.

Para representar a série de *N*-acil hidrazonas é demonstrado o espectro na região do IR do composto **4b** (Figura 5). Inicialmente, é possível observar o aparecimento de uma banda de absorção em 3216 cm<sup>-1</sup> referente a vibração N-H bem como em 3053 e 3029 cm<sup>-1</sup> os estiramentos C-H correspondentes a instauração e aos aromáticos, respectivamente. Os demais estiramentos C-H de alifáticos estão entre 2894 e 2780 cm<sup>-1</sup>.

**Figura 5.** Espectro na região do IR do composto **4b**.

Na ampliação do espectro (Figura 6), observa-se presença uma banda de alta, intensidade, em  $1644\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da carbonila e em  $1627$  e  $1609\text{ cm}^{-1}$  o estiramento imínico. Por fim, o aparecimento de bandas em  $1260$  e  $1038\text{ cm}^{-1}$  é associada a vibração C-O do anel de cinco membros de **4b**.

**Figura 6.** Ampliação do espectro na região do IR do composto **4b**.



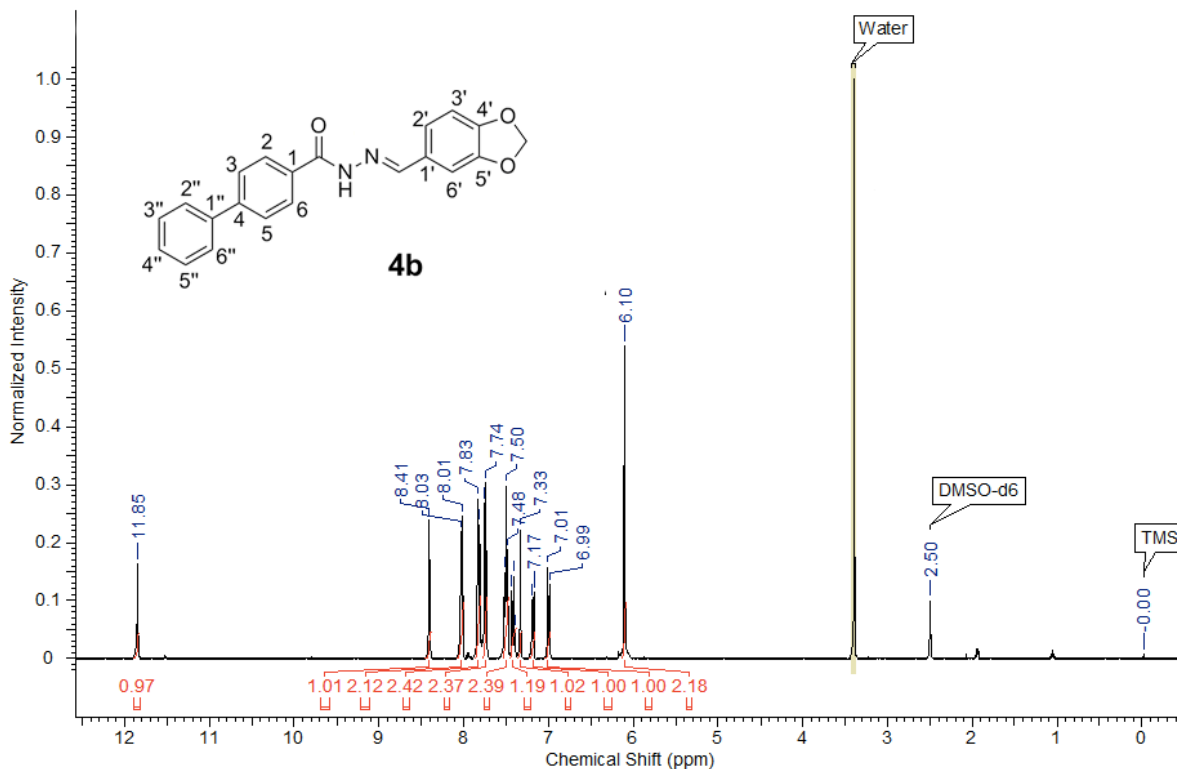
Todos os outros compostos apresentaram o mesmo perfil de espectro vibracional, podendo apontar a possível formação das *N*-acil hidrazonas **4a-k**.

### 5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Em seguida, foram realizados os espectros de  $^1\text{H}$  (200 ou 400MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50 ou 100MHz) utilizando DMSO como solvente, a fim de localizar os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos das NAHs sintetizadas. A numeração dos anéis foi atribuída de forma aleatória apenas para a identificação dos sinais.

Para todas as *N*-acil hidrazonas foram observados picos característicos do hidrogênio do carbono imínico e do hidrogênio ligado ao nitrogênio, ambos como simpleto (s). No espectro de NMR de  $^1\text{H}$  da *N*-acil hidrazona **4b** (Figura 7) se pode observar além desses sinais característicos (HC=N em 8,41 ppm e NH em 11,85 ppm) a presença dos 12 hidrogênios aromáticos, entre 6,99 e 8,03 ppm bem como dos 2 hidrogênios referentes ao carbono metileno (-O-CH<sub>2</sub>-O) em 6,10 ppm.

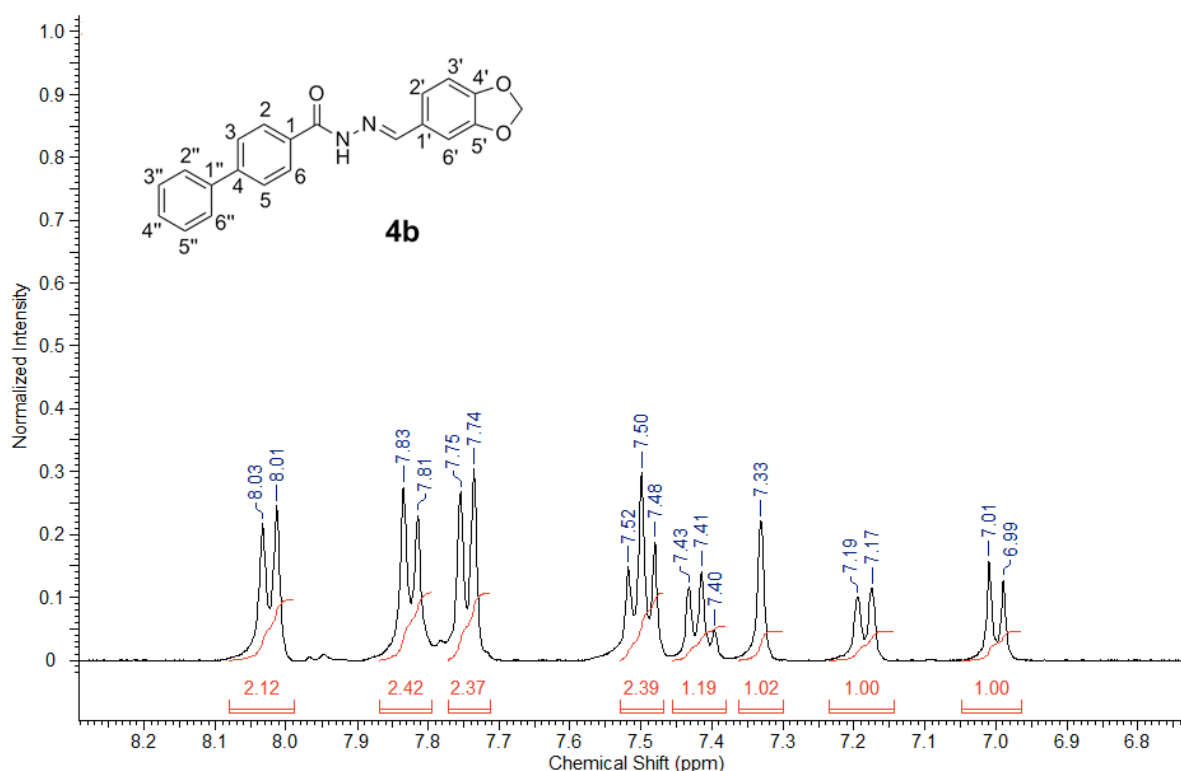
**Figura 7.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4b**.



Na ampliação do espectro de NMR de  $^1\text{H}$  da *N*-acil hidrazona **4b** (Figura 8) é possível observar em 7,00 ppm e 7,18 ppm os dois dupletos referentes aos

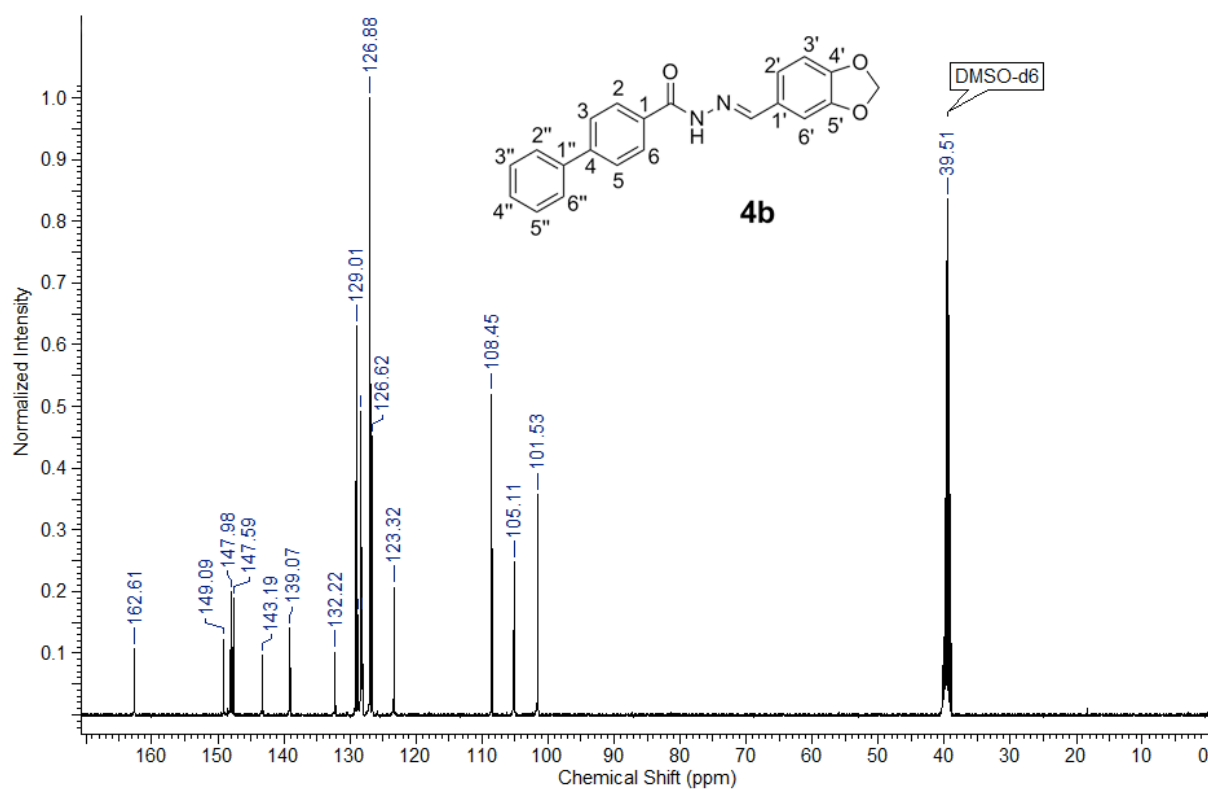
hidrogênios H2' e H3' com constantes de acoplamento  $J=8,07\text{Hz}$  e o singlete em 7,33 ppm referente ao hidrogênio H6'. O sinal referente ao hidrogênio H4'' aparece como um duplo duplete em 7,41 ppm com acoplamento  $J=7,09\text{Hz}$ , bem como os dois hidrogênios H3'' e H5'' em 7,50 ppm com acoplamento de  $J=7,34\text{Hz}$  também em forma de um duplo duplete. O restante dos hidrogênios aromáticos (H2'' e H6'', H3 e H5, H2 e H6) mostram-se em forma de dupletos em 7,75 ppm, 7,82 ppm, e 8,02 ppm, respectivamente, com constante de acoplamento  $J=8,07\text{Hz}$ .

**Figura 8.** Ampliação do espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4b**.



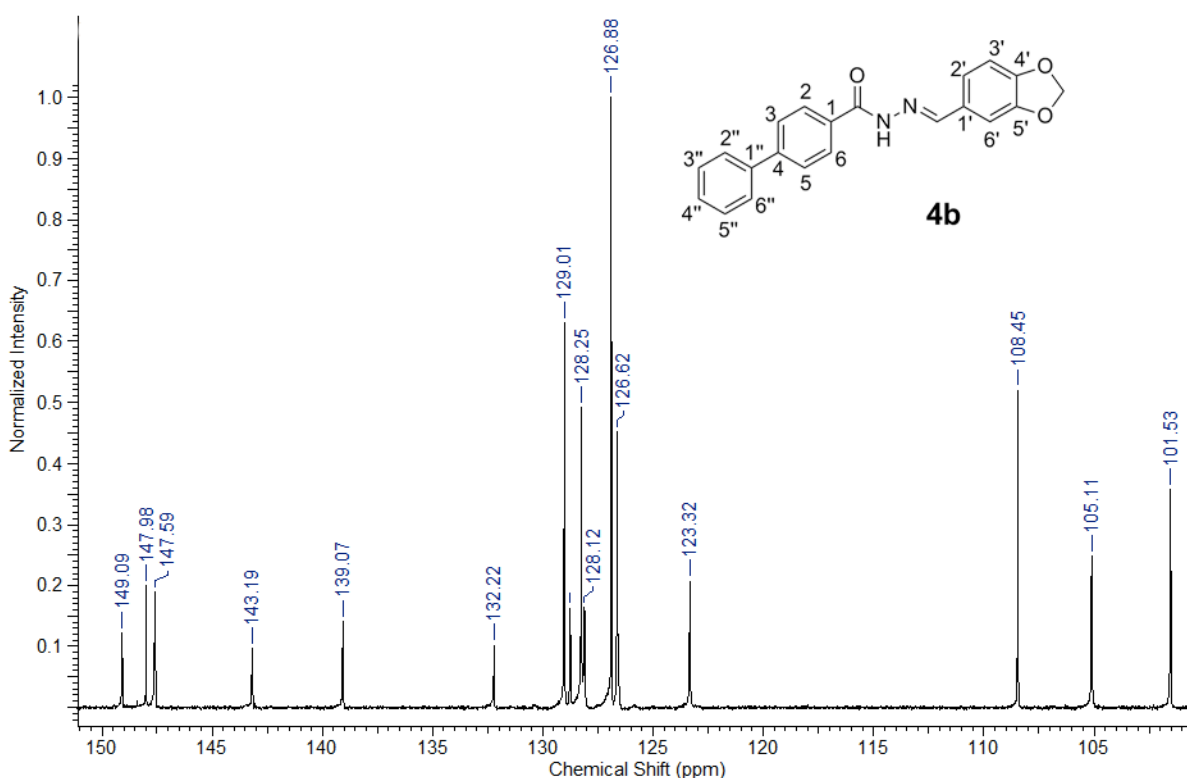
No espectro de  $^{13}\text{C}$  da *N*-acil hidrazona **4h** (Figura 9) pode-se observar a presença do sinal do carbono referente ao metileno em 101,5 ppm bem como os 14 sinais referentes aos carbonos aromáticos entre 105,1 e 147,9 ppm. Em 149,1 ppm o sinal do carbono imínico ( $-\text{N}=\text{CH}-$ ) e em 162,6 ppm o sinal característico a carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ).

**Figura 9.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4b**.



Na ampliação do espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  da *N*-acil hidrazona **4b** (Figura 10) foram observados os cinco sinais de carbonos quaternários (147,9, 147,5, 143,1, 139,0 e 132,2 ppm).

**Figura 10.** Ampliação do espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4b**.

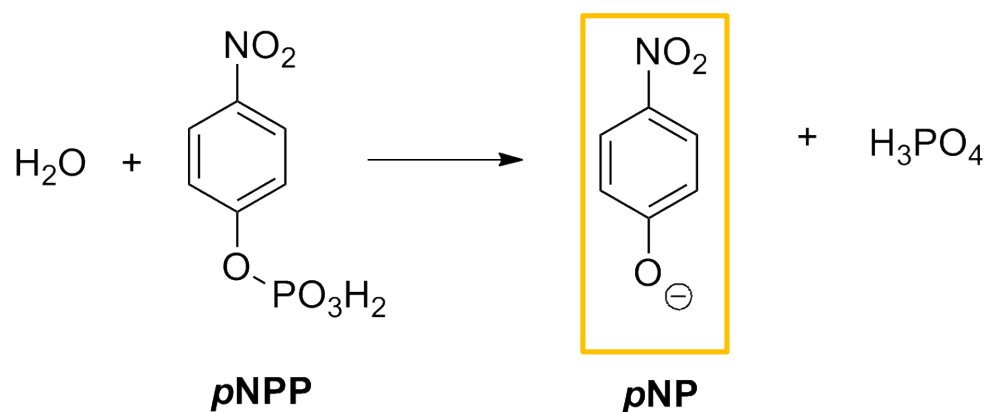


Todas as *N*-acil hidrazonas sintetizadas no presente trabalho foram caracterizadas por NMR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e apresentaram o mesmo padrão de espectro, com os sinais característicos que confirmam a formação dos produtos desejados (descritos na sessão Apêndice).

#### 5.4 Atividade biológica

Após a caracterização dos compostos, os mesmos foram submetidos a testes de medidas de atividade residual de PtpA. Conforme descrito na sessão experimental, a triagem inicial foi realizada preparando soluções *N*-acil hidrazonas **4a-k**  $25\ \mu\text{mol L}^{-1}$  em DMSO. O composto **4j** foi descartado para o teste devido a sua baixa solubilidade em DMSO.

Como substrato artificial de fosfatase foi utilizado *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP), que é clivado pela ação da enzima, formando *p*-nitrofenolato (*p*NP), de coloração amarela. A quantificação de *p*NP formado pode ser feita a partir da sua absorbância através de UV-Vis a 405 nm (Figura 11).

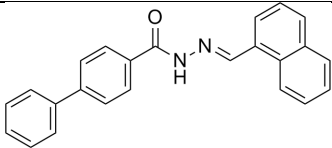
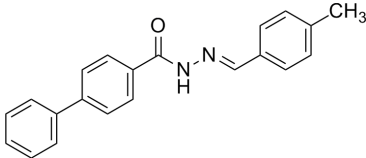
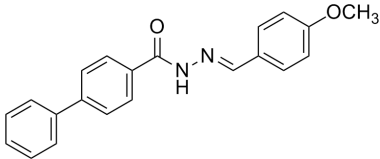
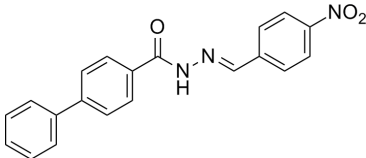
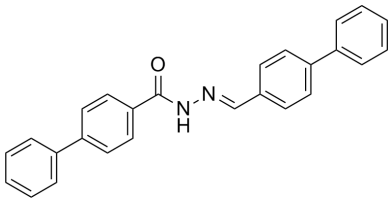
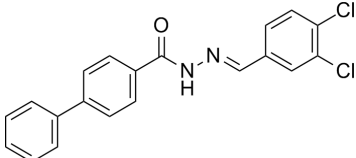
**Figura 11.** Reação de clivagem do pNPP catalisada pelas enzimas PTPs.

Com isto, foram calculadas as porcentagens de inibição da PtpA de Mtb e os dados obtidos estão listados na Tabela 3, onde quanto maiores os valores de porcentagem obtida, maior a atividade inibitória da *N*-acil hidrazona frente a proteína.

**Tabela 3.** Atividade de inibição de PtpA (%) na presença de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  das *N*-acil hidrazonas.

	Composto	PtpA (% $\pm$ DP)
4a		36,34 $\pm$ 4,37
4b		49,61 $\pm$ 5,53
4c		54,94 $\pm$ 12,89
4d		54,92 $\pm$ 11,08
4e		49,90 $\pm$ 1,39

**Tabela 3.** Atividade de inibição de PtpA (%) na presença de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  das *N*-acil hidrazonas (continuação).

<b>4f</b>		$31,46 \pm 6,27$
<b>4g</b>		$33,53 \pm 5,19$
<b>4h</b>		$60,50 \pm 3,42$
<b>4i</b>		$17,43 \pm 2,65$
<b>4j</b>		Não realizado
<b>4k</b>		$80,73 \pm 2,70$

Nota: Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP de três experimentos feitos em triplicata.

Pelo conjunto de dados obtidos no teste, se pode observar que a presença do anel bifenílico é importante na inibição da proteína, sendo que todos os compostos obtiveram uma inibição acima de 30% com exceção do **4i** ( $17,43 \pm 2,65$ ) substituído com 4-nitro. Diferentemente de outra série de compostos bifenílicos<sup>15</sup>, o grupamento fortemente retirador de elétrons não se mostrou relevante para a inibição da proteína.

Mostra-se importante a presença dos halogênios cloro e bromo para a atividade biológica, observada nos compostos **4c** ( $54,94 \pm 12,89\%$ ), **4d** ( $54,92 \pm 11,08\%$ ) e especialmente o **4k** ( $80,73 \pm 2,70\%$ ) substituído com cloro nas posições meta e para,

sendo o melhor resultado da série. Quando comparados com trabalhos anteriores, onde os halogênios também foram relevantes para a atividade como substituintes em anéis hidrofóbicos, as *N*-acil hidrazonas halogenadas se mostraram compatíveis com a literatura, sendo inibidores potentes e eficazes.<sup>16 32</sup>

Por fim, outro substituinte que obteve uma boa atividade inibitória foi a metoxila, observada no composto **4h** ( $60,50 \pm 3,42$ ) mostrando que a presença de um anel hidrofóbico (Anel A) combinada com mais um grupamento que permite fazer ligação de hidrogênio promove um maior potencial inibitório frente a PtpA de Mtb, assim como o composto **4b** ( $49,61 \pm 5,53$ ). Este tipo de relação estrutura/atividade já foi reportada na literatura, mostrando que os resultados foram compatíveis com o esperado.<sup>31,32</sup>

## 6 CONCLUSÃO

Através de rotas sintéticas simples, foi sintetizada inicialmente a *N*-acil hidrazida precursora **2** para a posterior síntese de onze *N*-acil hidrazonas **4a-k**, das quais cinco inéditas na literatura. Todos os compostos foram obtidos com rendimentos satisfatórios, mostrando uma metodologia de síntese eficaz, e então caracterizados por ponto de fusão, IR, NMR de  $^1\text{H}$  e NMR de  $^{13}\text{C}$ .

As *N*-acil hidrazonas foram submetidas a avaliação inibitória frente à PtpA de Mtb, com exceção do composto **4j** devido a baixa solubilidade em DMSO.

Os compostos **4c**, **4d**, **4h** e **4k** apresentaram os melhores resultados, mostrando que tanto substituintes metoxila, cloro e bromo são importantes para a atividade biológica. A esses serão feitos testes de seletividade, bem como determinação do  $\text{IC}_{50}$  e seu mecanismo de ação através de estudos cinéticos.

Como perspectivas futuras, é interessante a síntese de novas NAHs para avaliação inibitória frente a PtpA, utilizando outros halogênios e diferentes posições de substituição no anel, bem como o grupamento metoxila.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

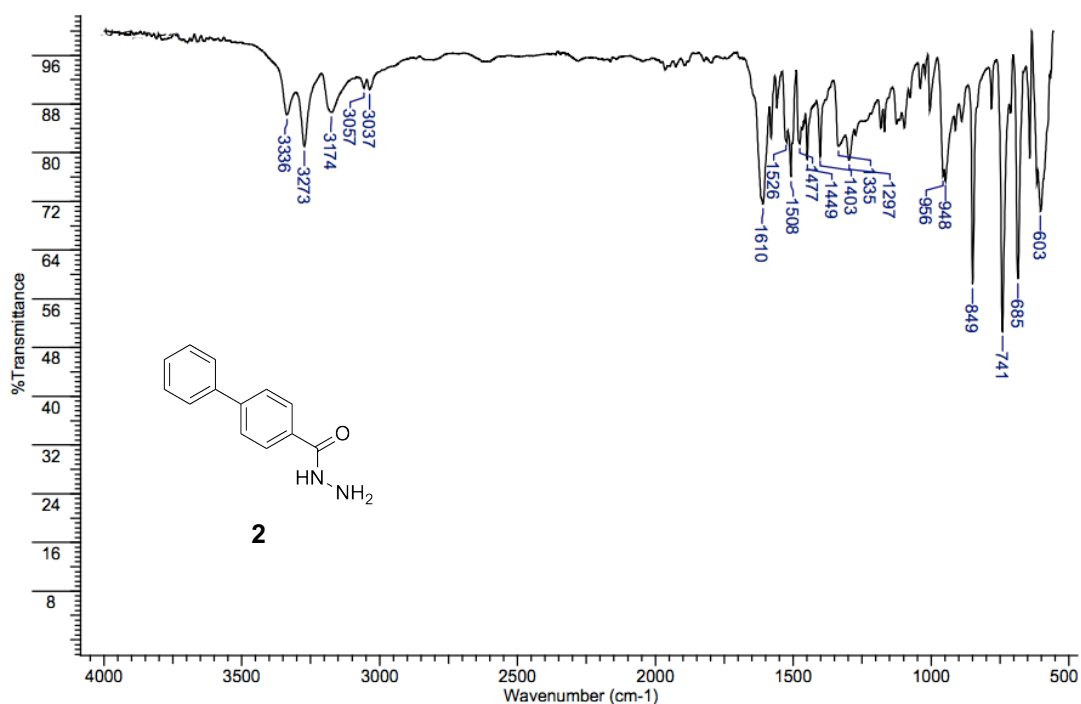
- <sup>1</sup> WERMUTH, C. G. *et al.* Glossary of terms used in Medicinal Chemistry. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 1998. Disponível em: <<https://www.iupac.org/publications/pac/pdf/1998/pdf/7005x1129.pdf>>. Acesso em: 23 agosto 2017.
- <sup>2</sup> AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. B. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 38, p. 868-873, 2015.
- <sup>3</sup> WERMUTH, C. **The Practice Of Medicinal Chemistry**. 4 edição. ed. [S.l.]: Academic Press, 2015.
- <sup>4</sup> VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. **Agência Fiocruz de Notícias**. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 03 junho 2017.
- <sup>5</sup> NALL, R. Tuberculosis, 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/tb/en/>>. Acesso em: 20 agosto 2017.
- <sup>6</sup> MCINTOSH, J. Tuberculosis: Causes, Symptoms, and Treatments. **Medical News Today**, 2017. Disponível em: <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/8856.php>>. Acesso em: 20 maio 2017.
- <sup>7</sup> WHO. Global Tuberculosis Report, 2016. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf?ua=1>> Acesso em: 06 outubro 2017.
- <sup>8</sup> NOGUEIRA, A. F. *et al.* Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, p. 3-9, 2012.
- <sup>9</sup> FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Elsevier Health**, v. 95, p. 527-531, 2015.
- <sup>10</sup> HESTVIK, A. L. K.; HMAMA, Z.; AV-GAY, Y. Kinome Analysis of Host Response to Mycobacterial Infection: a Novel Technique in Proteomics. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 5514-5522, 2003.
- <sup>11</sup> BALARAM VAR, V. M. E. A. Identification of novel PTP1B inhibitors by pharmacophore based virtual screening, scaffold hopping and docking. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 578-594, 2014.
- <sup>12</sup> MASCARELLO, A. *et al.* Discovery of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB) Inhibitors from Natural Products. **PLoS One**, v. 8, p. 10, 2013.
- <sup>13</sup> MANGER, M. *et al.* Discovery of Mycobacterium Tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase A (MptpA) Inhibitors Based on Natural Products and a Fragment-Based Approach. **ChemBioChem**, v. 6, p. 1749 – 1753, 2005.

- <sup>14</sup> CHIARADIA, L. D. *et al.* Synthesis, Biological Evaluation, And Molecular Modeling of Chalcone Derivatives As Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatases (PtpA and PtpB). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 390–402, 2012.
- <sup>15</sup> BERENS, J. **Síntese de chalconas bifenílicas com potencial atividade inibitória frente as proteínas tirosina fosfatases (PtpA e PtpB) de Mycobacterium tuberculosis**. 2015. 64 f. Trabalho de conclusão de curso (TCC) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- <sup>16</sup> RAWLS, K. A. *et al.* Fragment-based discovery of selective inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 24, p. 6851–6854, 2009.
- <sup>17</sup> MAIA, R. D. C.; TESCH, R.; FRAG, C. A. M. Acylhydrazone derivatives: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 11, p. 1161-1170, 2014.
- <sup>18</sup> SUGIURA, M.; KOBAYASHI, S. *N*-Acylhydrazones as Versatile Electrophiles for the Synthesis of Nitrogen-Containing Compounds. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 33, p. 5176-5186, 2005.
- <sup>19</sup> VERMA, G. *et al.* A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 69-80, 2014.
- <sup>20</sup> GORANTLA, V. *et al.* Molecular hybrid design, synthesis and biological evaluation of *N*-phenyl sulfonamide linked *N*-acyl hydrazone derivatives functioning as COX-2 inhibitors: new anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-bacterial agents. **New Journal of Chemistry**, v. 41, p. 13516-13532, 2017.
- <sup>21</sup> MASCARELLO, A. **Busca racional por moléculas bioativas em modelos de diabetes, leucemia e tuberculose**. 2012. 185 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.
- <sup>22</sup> SIDDIQUI, S. M.; SALAHUDDIN, A.; AZAM, A. Synthesis, characterization and antiamebic activity of some hydrazone and azole derivatives bearing pyridyl moiety as a promising heterocyclic scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 411-416, 2012.
- <sup>23</sup> HERNANDEZ P. *et al.* Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2158-2171, 2012.
- <sup>24</sup> TROEBERG, L. *et al.* Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured Trypanosoma brucei brucei. **Molecular Medicine (New York)**, v. 6, p. 660-669, 2000.
- <sup>25</sup> TRIVEDI, V.; SHAH, S. H. Synthesis, characterization and antibacterial screening of some novel biphenyl-4-carboxylic acid (4-benzylidene- 5-oxo-2-substituted phenyl-4,5-dihydro-imidazol-1-yl)-amide. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 25, n. 4, p. 893-899, 2009.

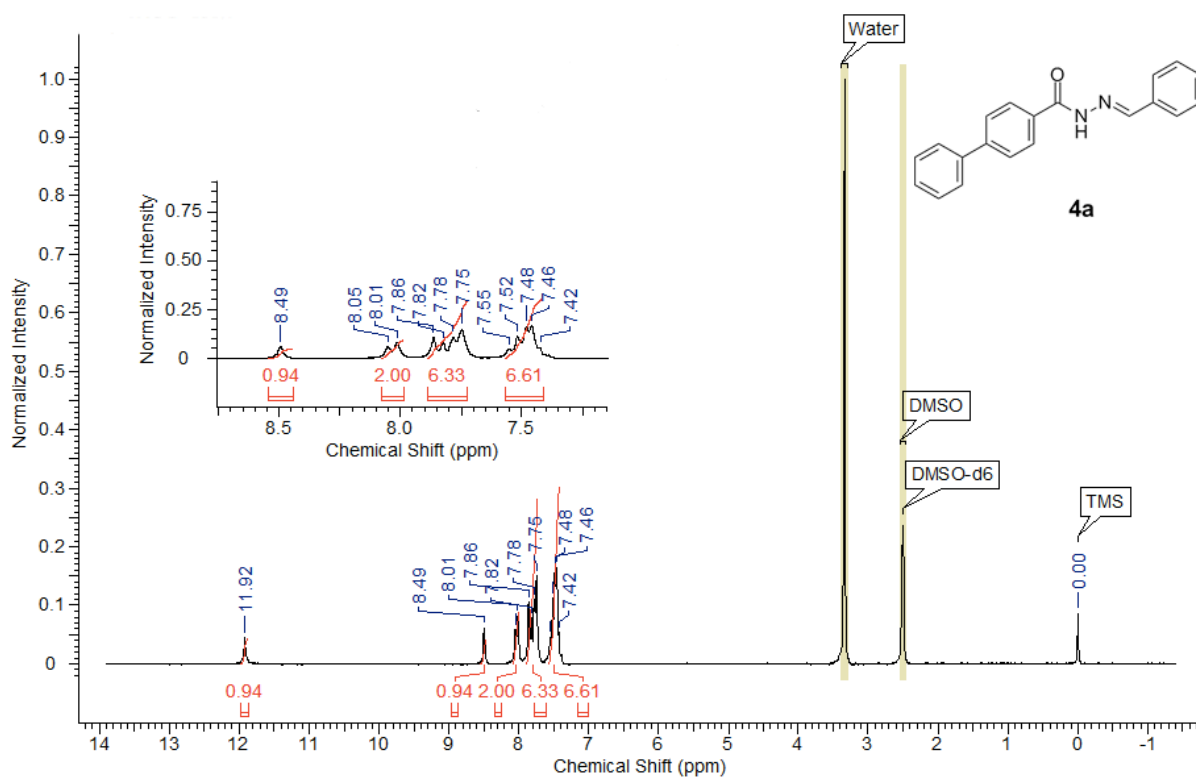
- <sup>26</sup> DEEP, A. Design and biological evaluation of biphenyl-4-carboxylic acid hydrazide-hydrazone for antimicrobial activity. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 3, p. 255-259, 2010.
- <sup>27</sup> RAKESH, K.; M. SHAHAR, Y.; BIRENDRA, S. Synthesis and Biological Screening of Some Novel Oxadiazole Derivatives. **International Journal of PharmTech Research**, v. 6, n. 1, p. 316-322, 2014.
- <sup>28</sup> YURACHKA, V. V. Microwave-Assisted Synthesis of Biphenyl-4,4'-dicarboxylic Acid Arylhydrazones in Water Medium. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 335–337, 2014.
- <sup>29</sup> ZHI, L. Preparation of small molecule hematopoietic growth factor mimetic compounds that activate hematopoietic growth factor receptors. **U.S. Pat. Appl. Publ.**, 2010.
- <sup>30</sup> TOPLISS, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 1006-1011, 1972.
- <sup>31</sup> CHIARADIA, L. D. Synthetic chalcones as efficient inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 23, p. 6227–6230, 2008.
- <sup>32</sup> BERENS, J. **Síntese de pirazolinias via reação one-pot irradiada por micro-ondas e avaliação da atividade inibitória frente a PtpA de *Mycobacterium tuberculosis***. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

## 8 APÊNDICE

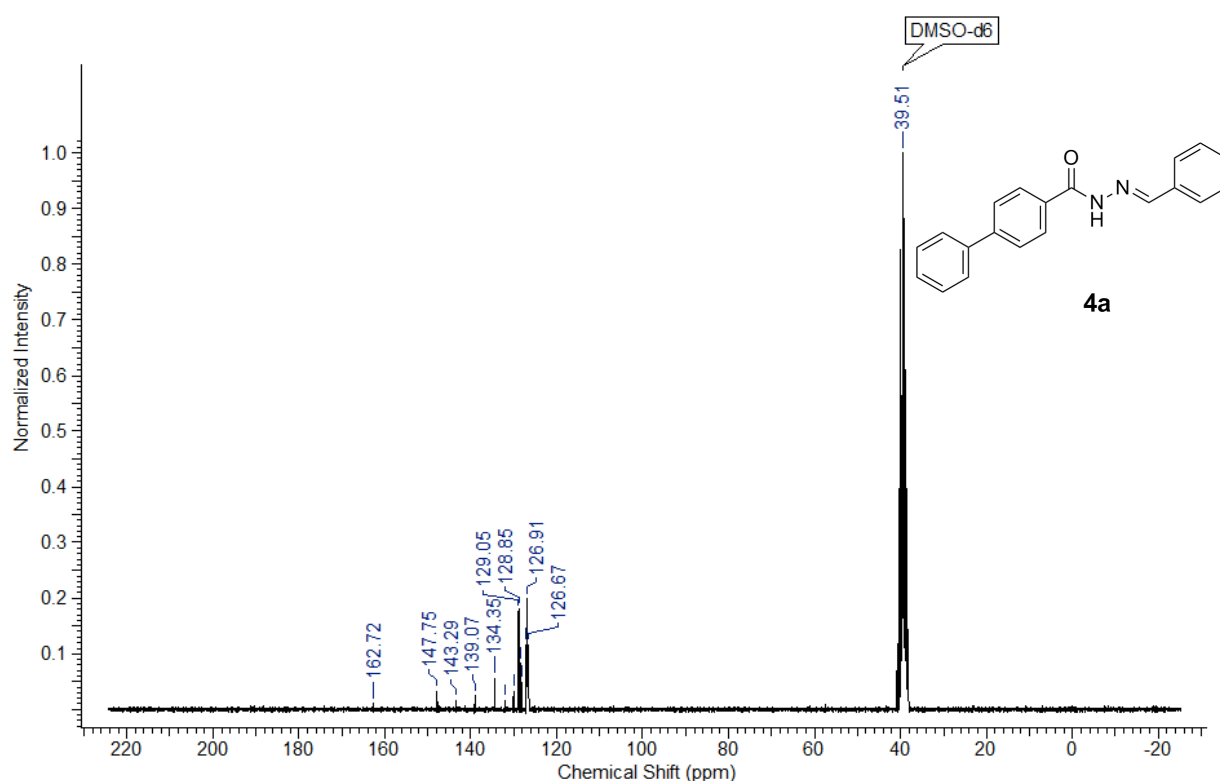
**Figura 12.** Espectro na região do IR obtido a partir de Refletância Total Atenuada (ATR) do composto **2**.



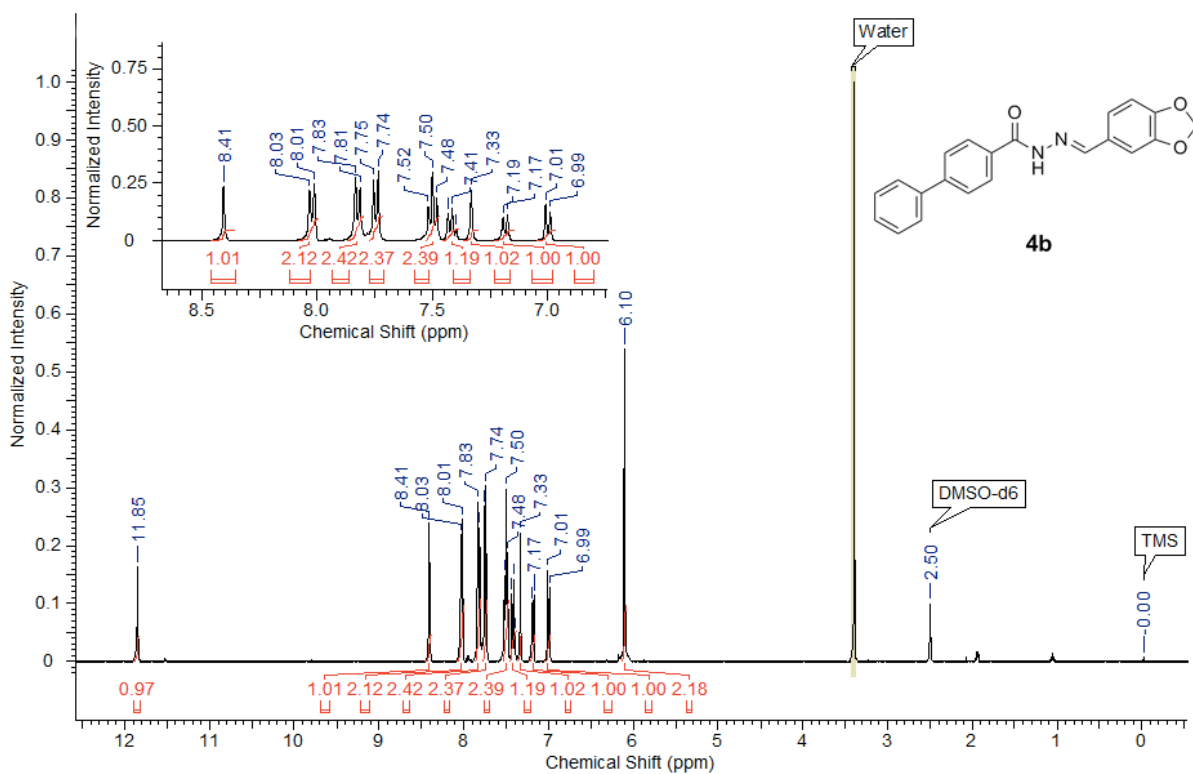
**Figura 13.** Espectro de NMR de <sup>1</sup>H do composto **4a**.



**Figura 14.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4a**.

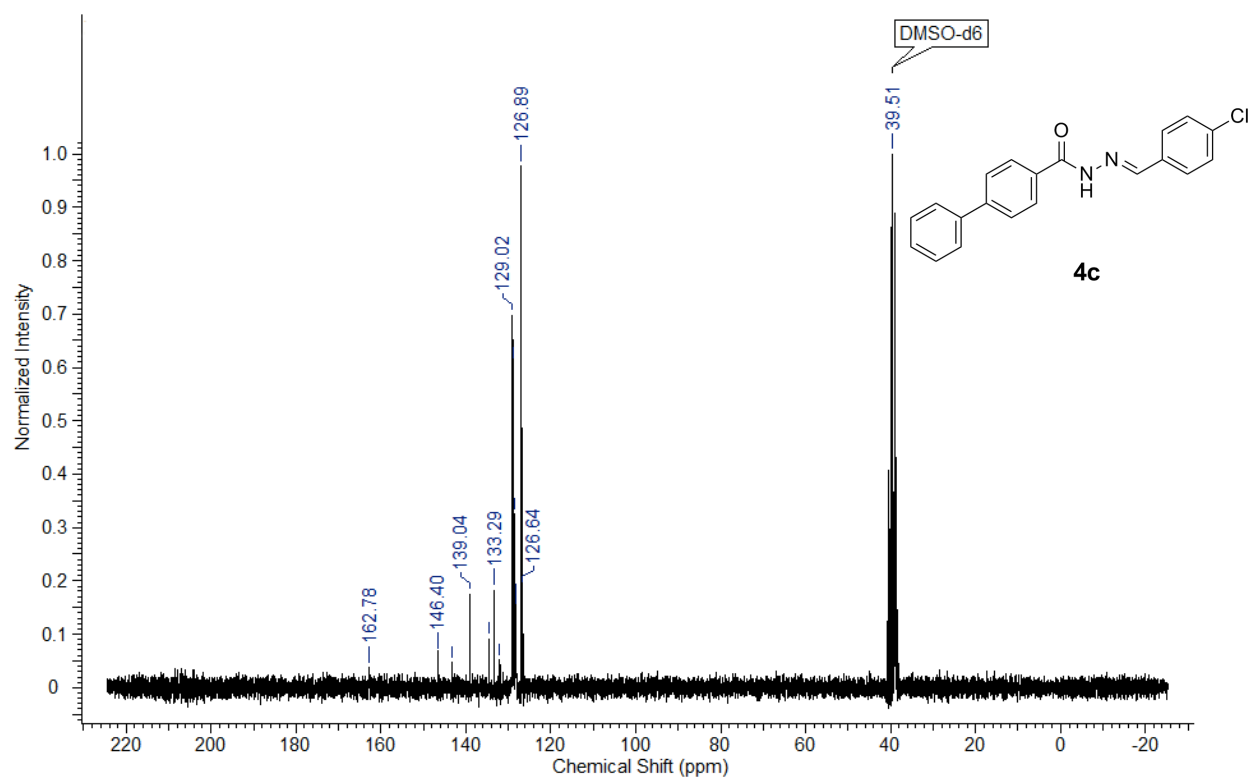


**Figura 15.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4b**.

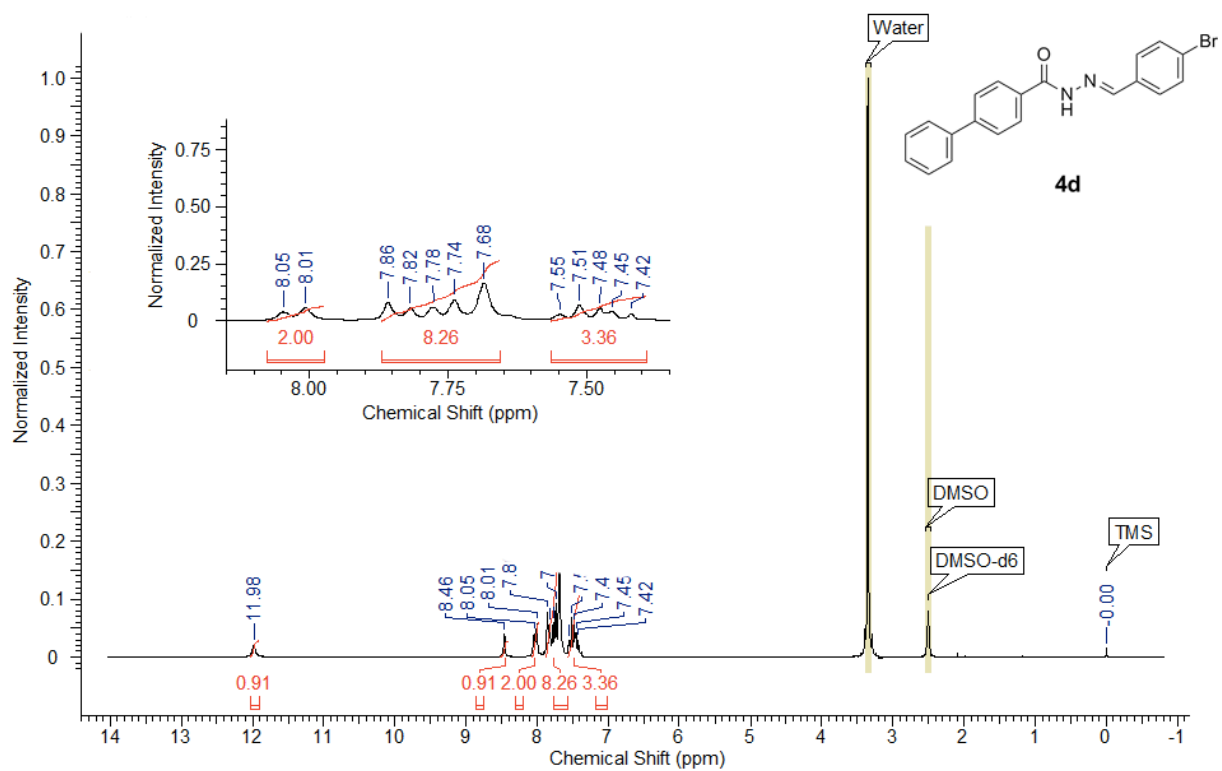




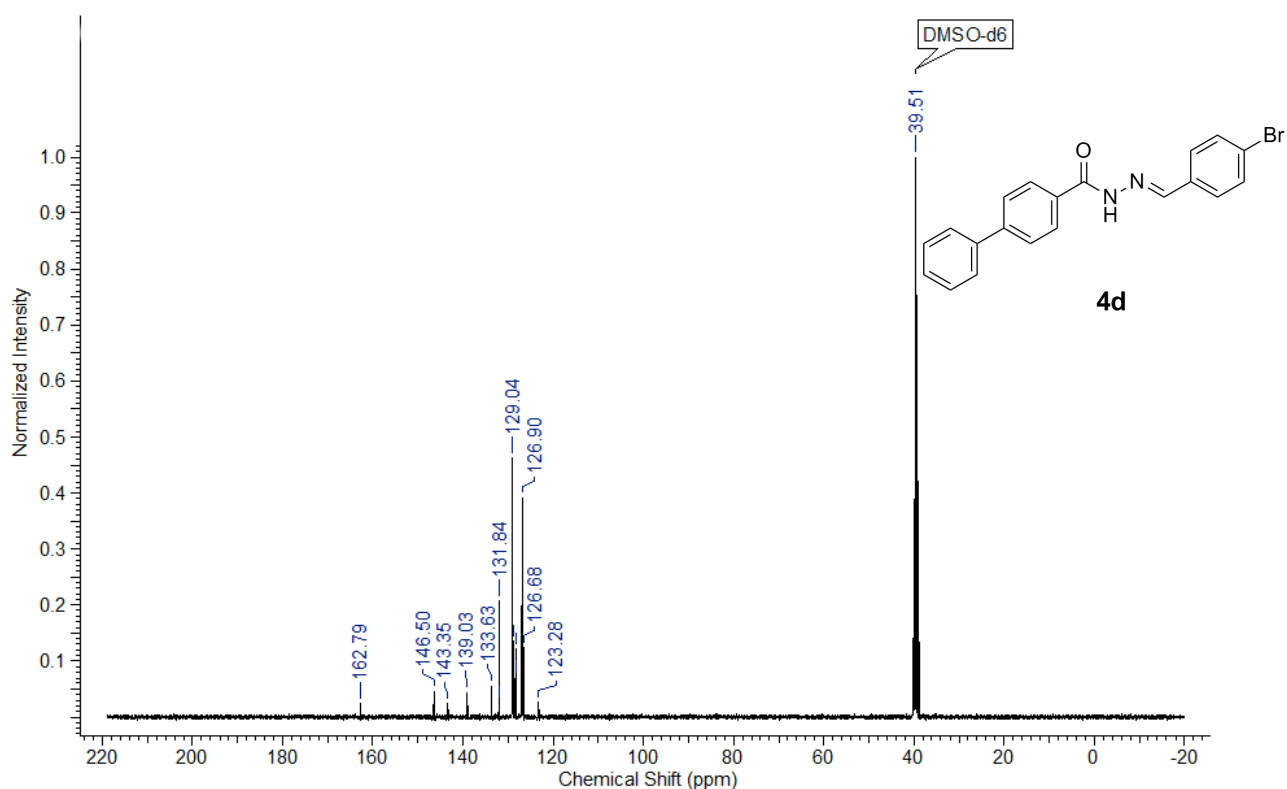
**Figura 18.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4c**.



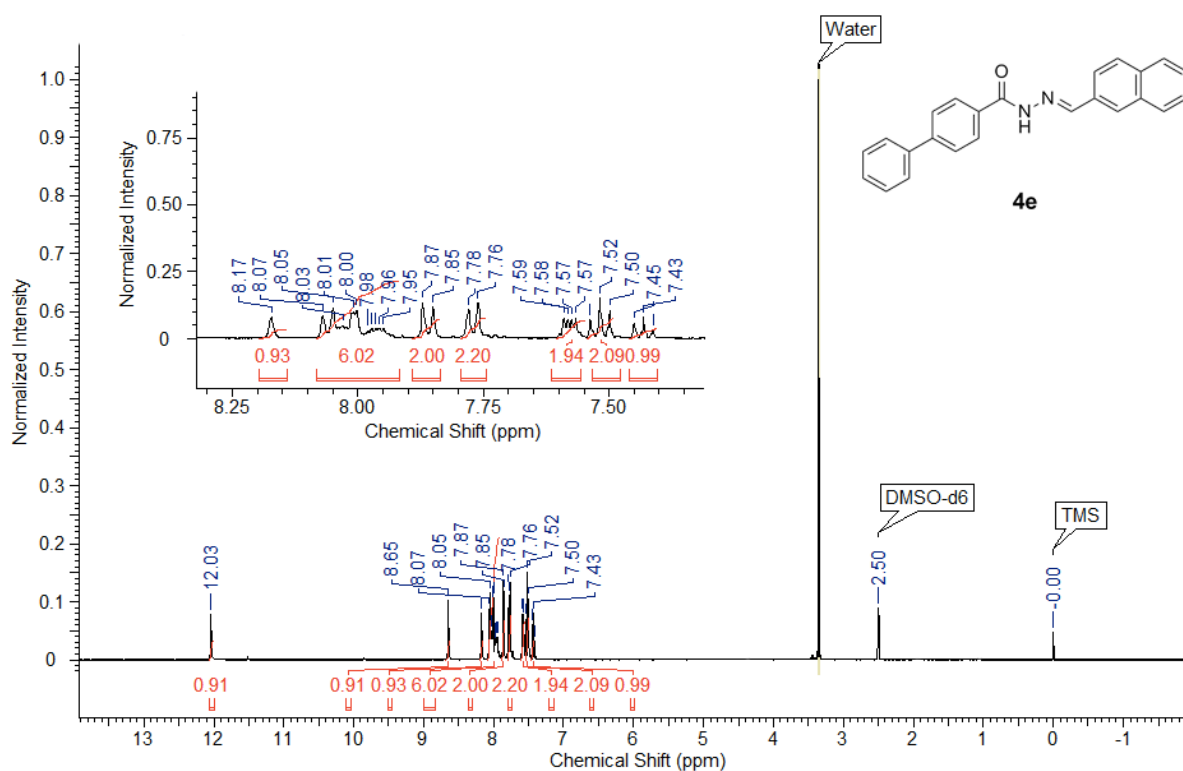
**Figura 19.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4d**.



**Figura 20.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4d**.

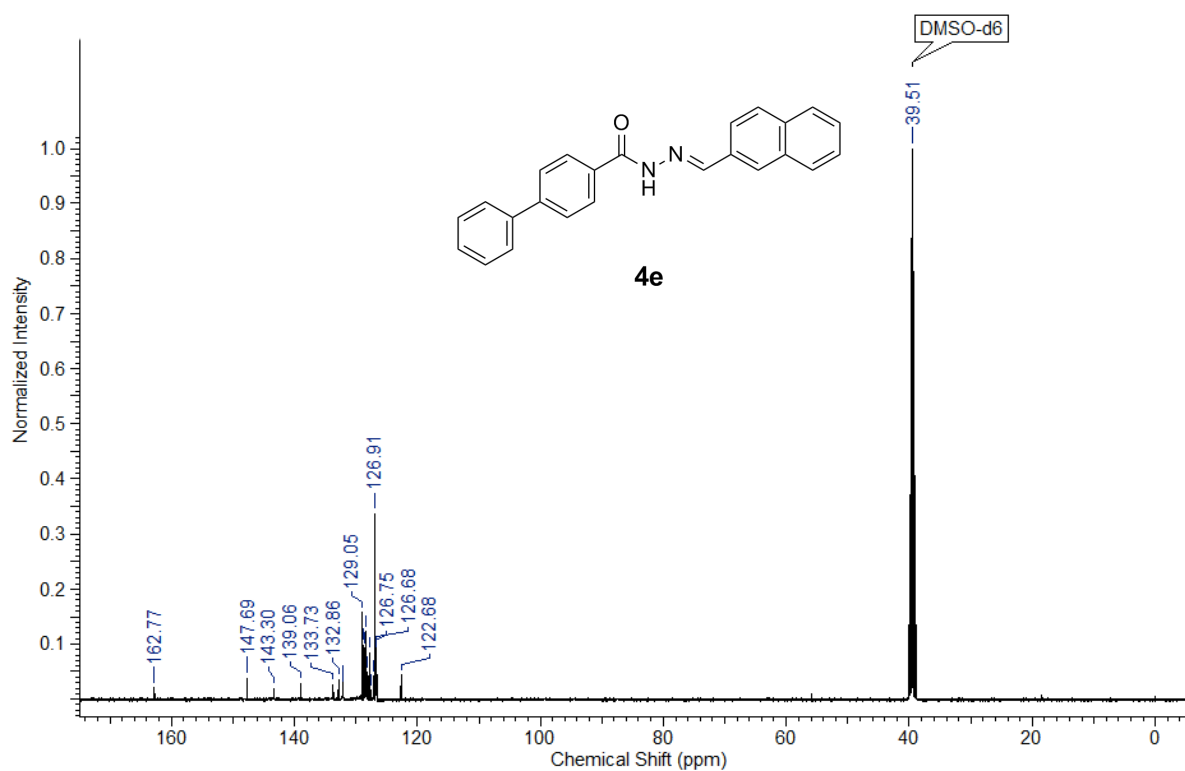


**Figura 21.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4e**.

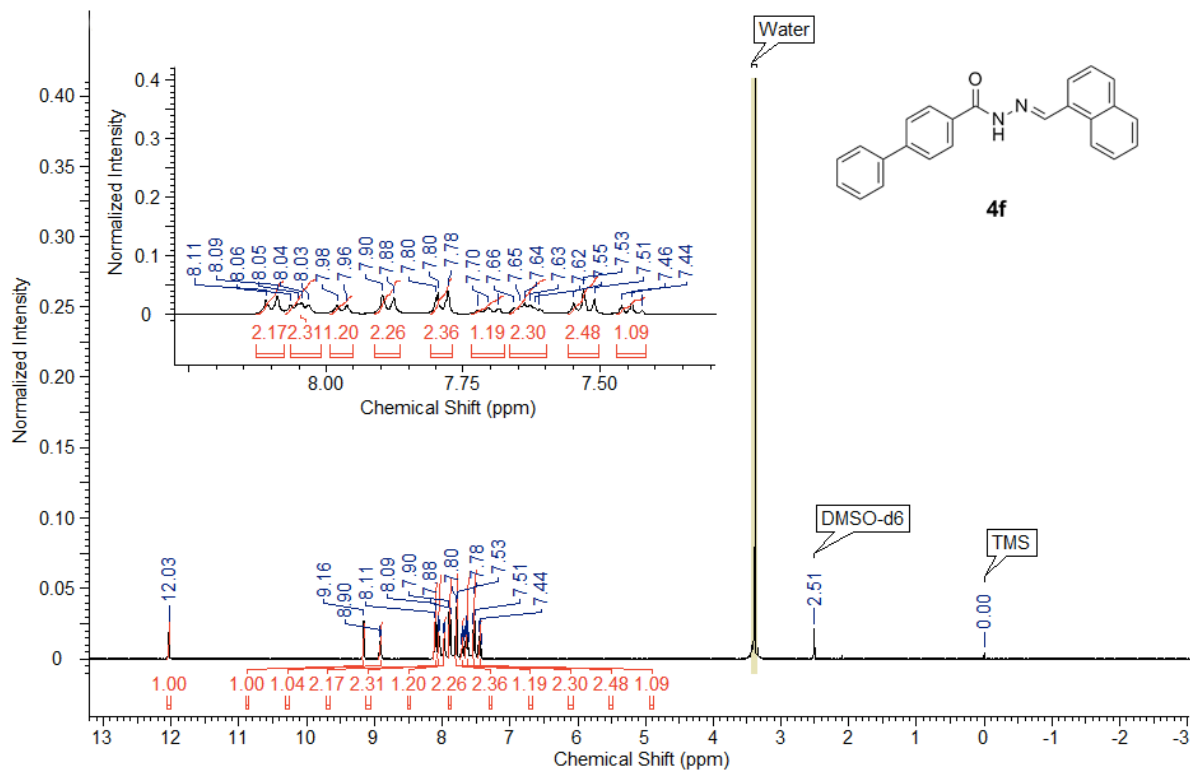




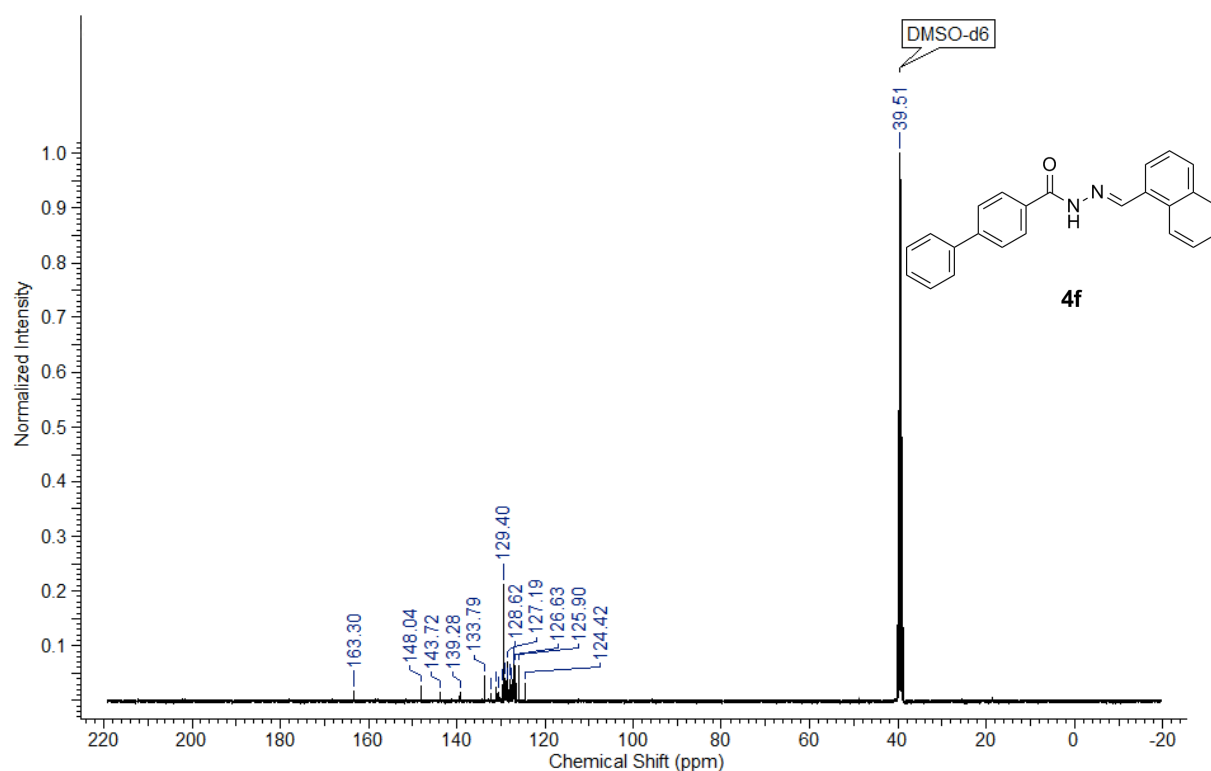
**Figura 22.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4e**.



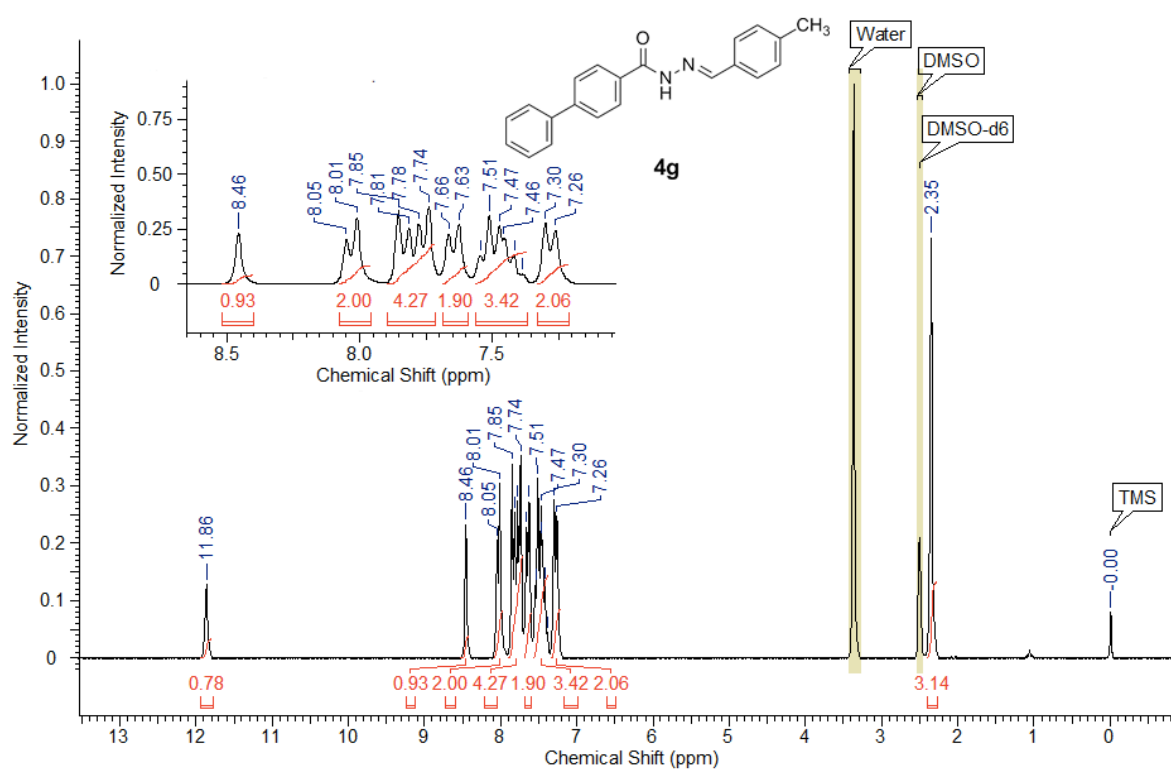
**Figura 23.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4f**.



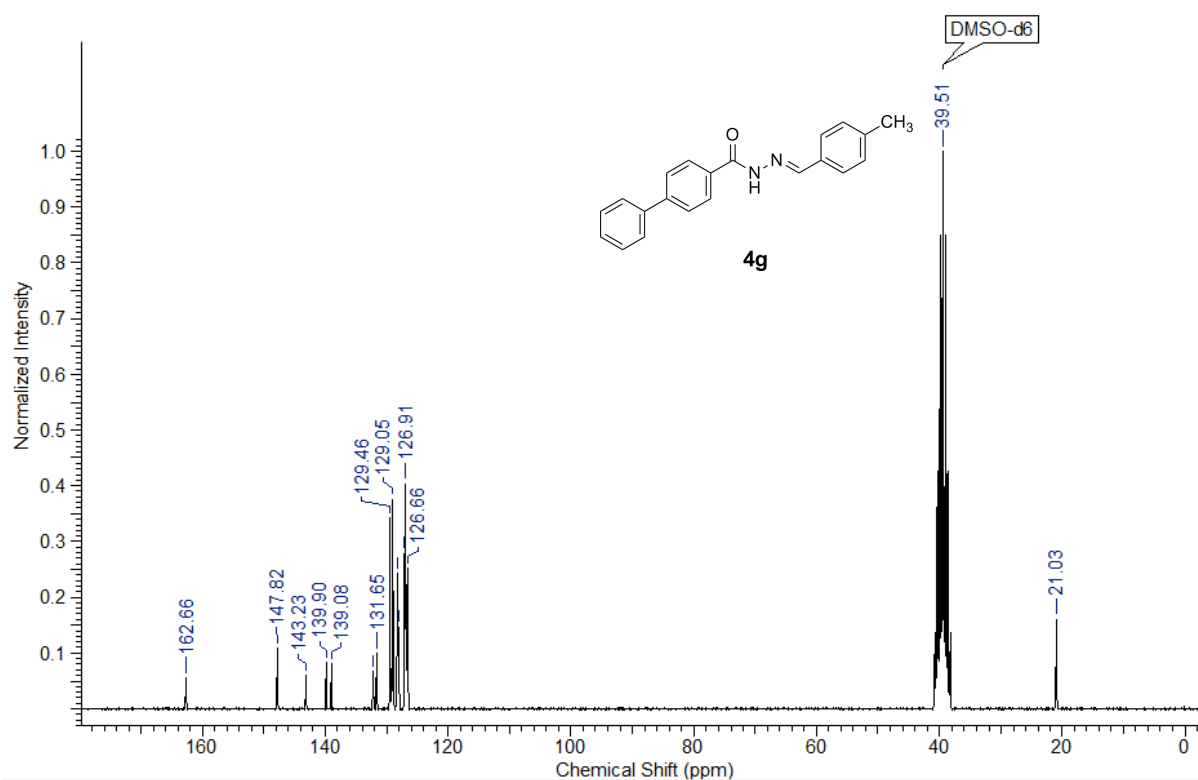
**Figura 24.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4f**.



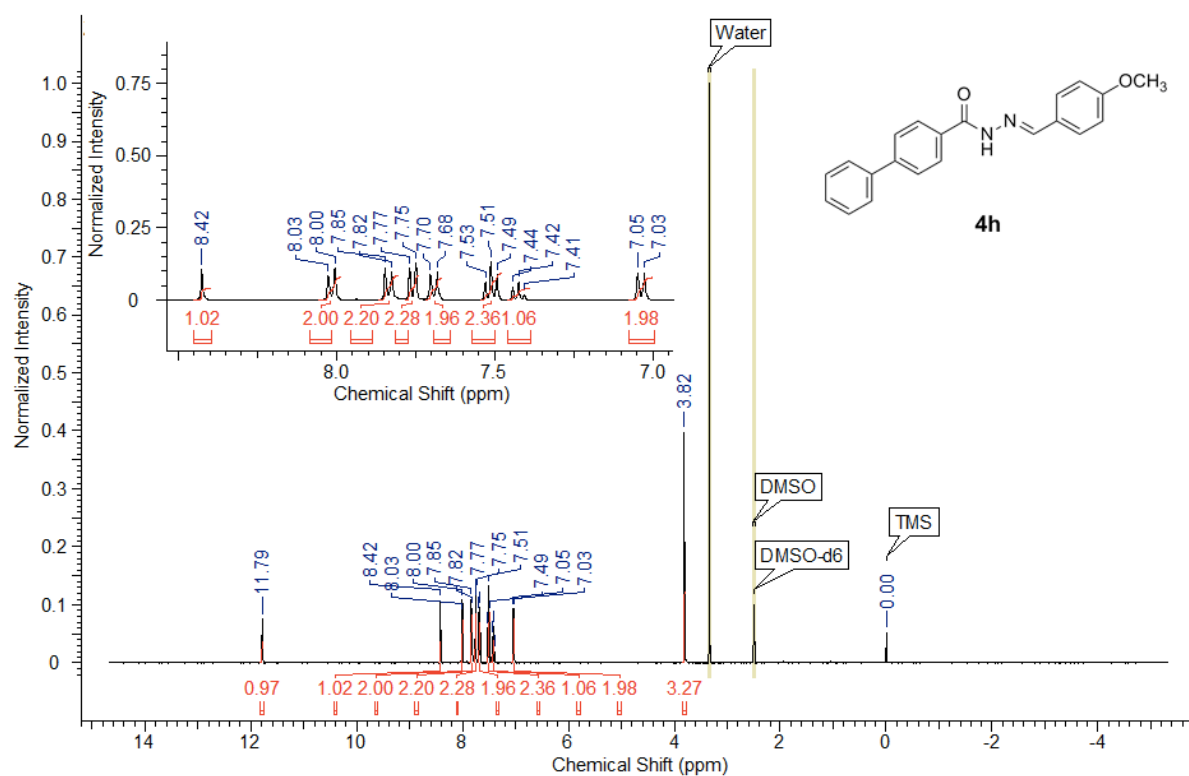
**Figura 25.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4g**.



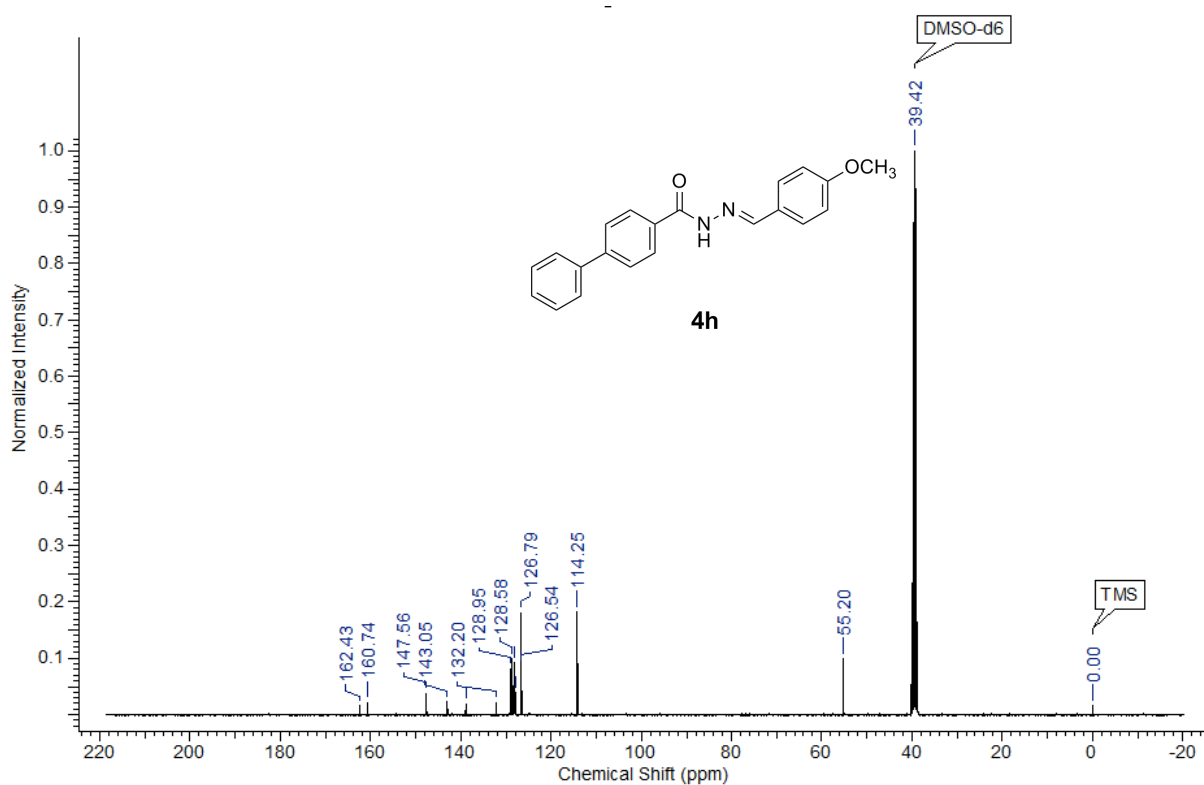
**Figura 26.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4g**.



**Figura 27.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4h**.



**Figura 28.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4h**.



**Figura 29.** Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4i**.

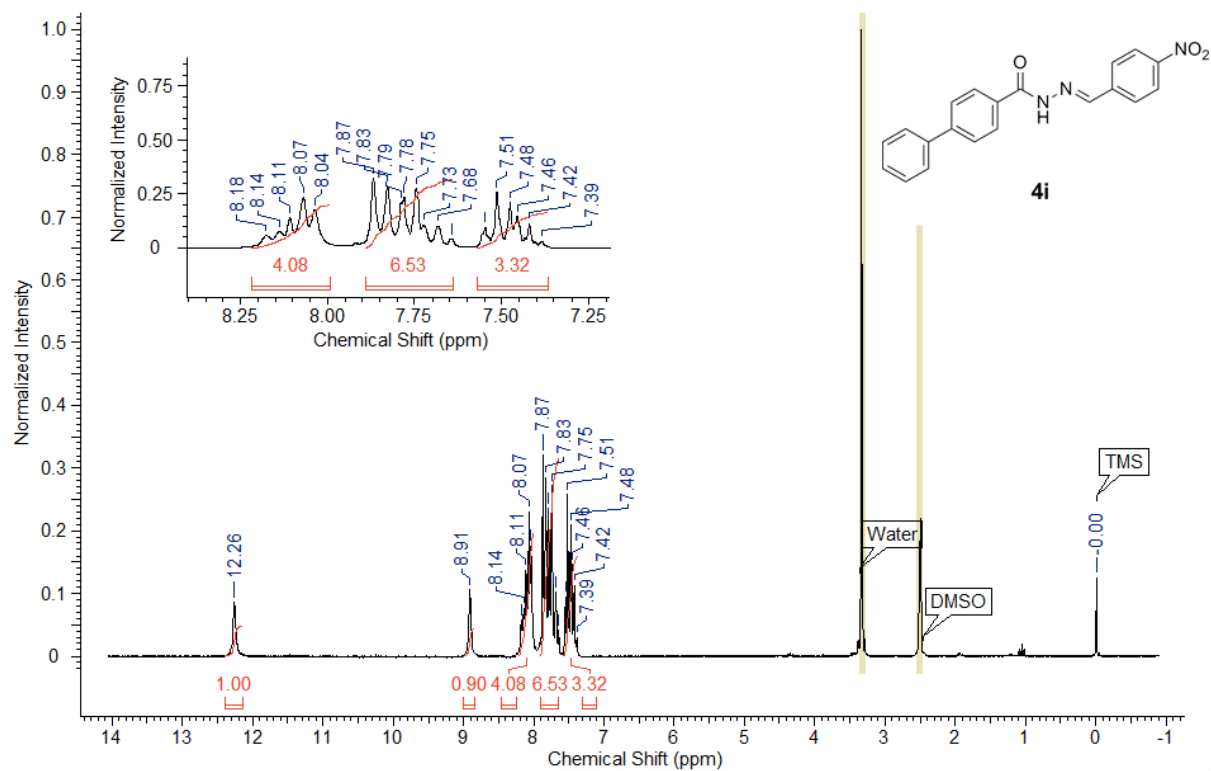


Figura 30. Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4i**.

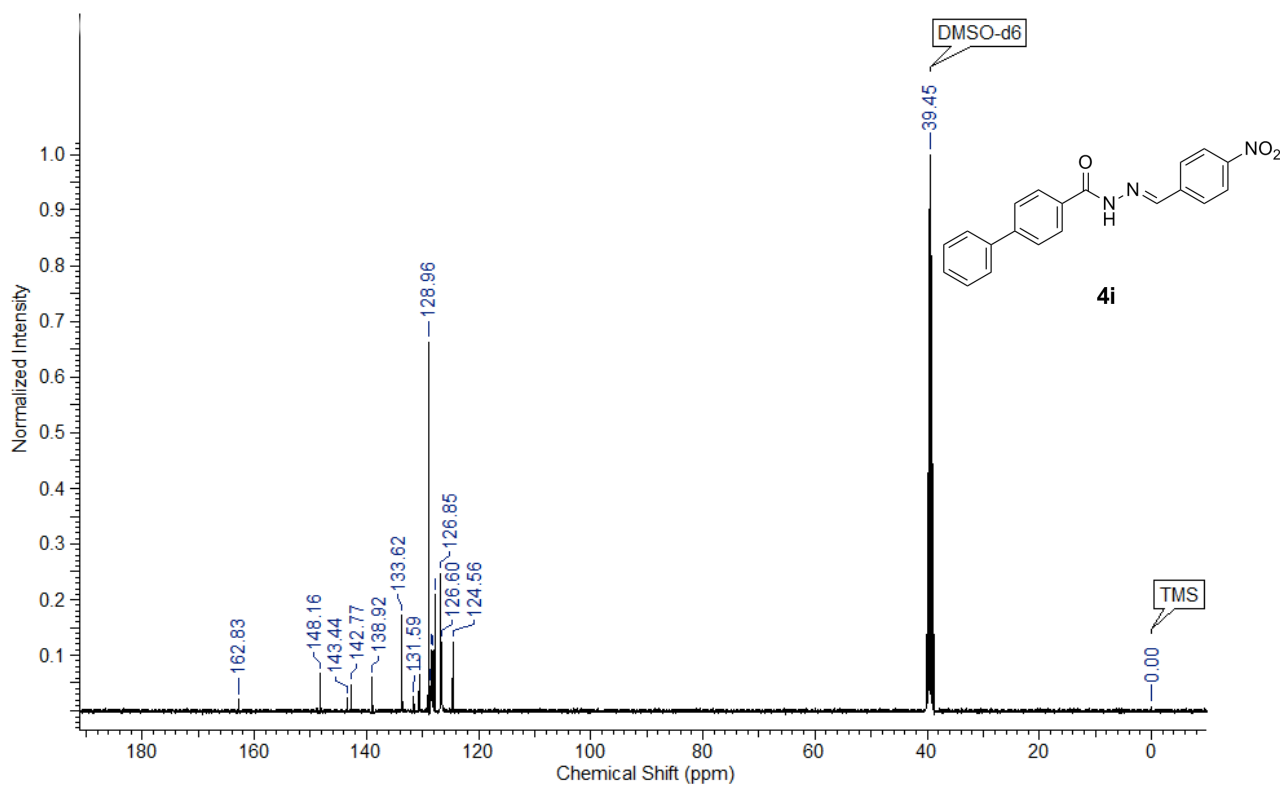
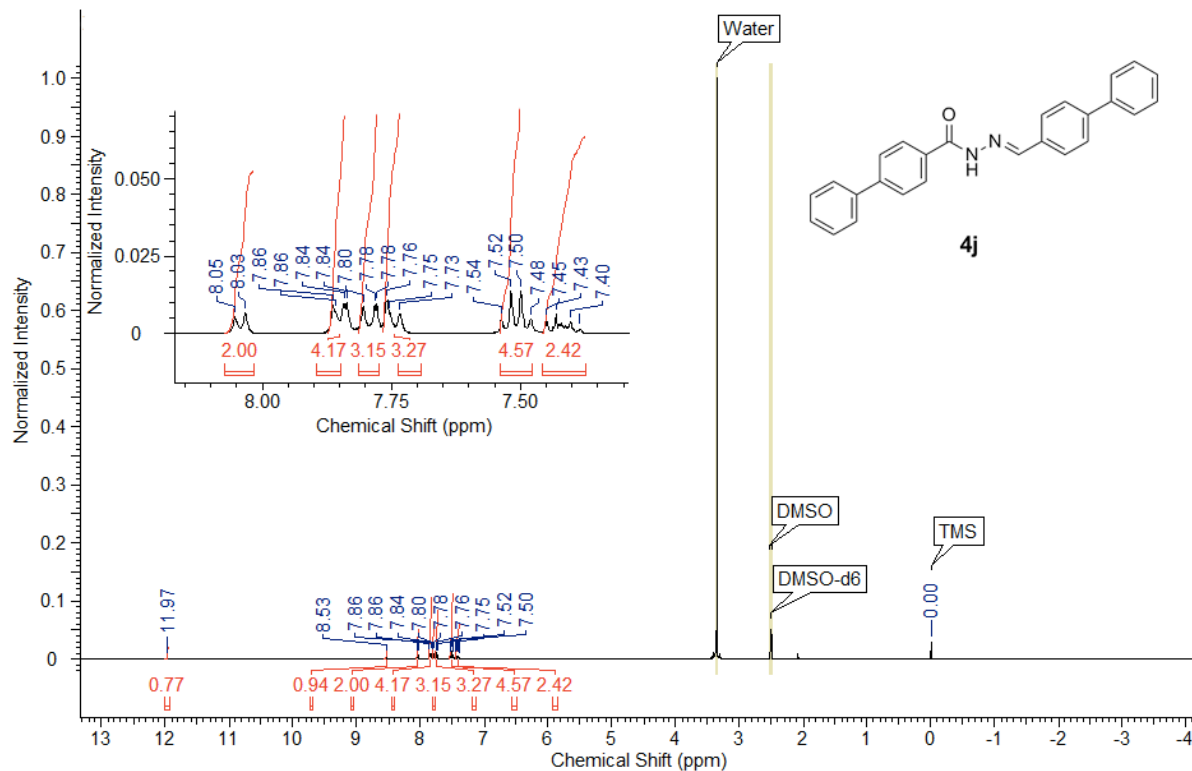
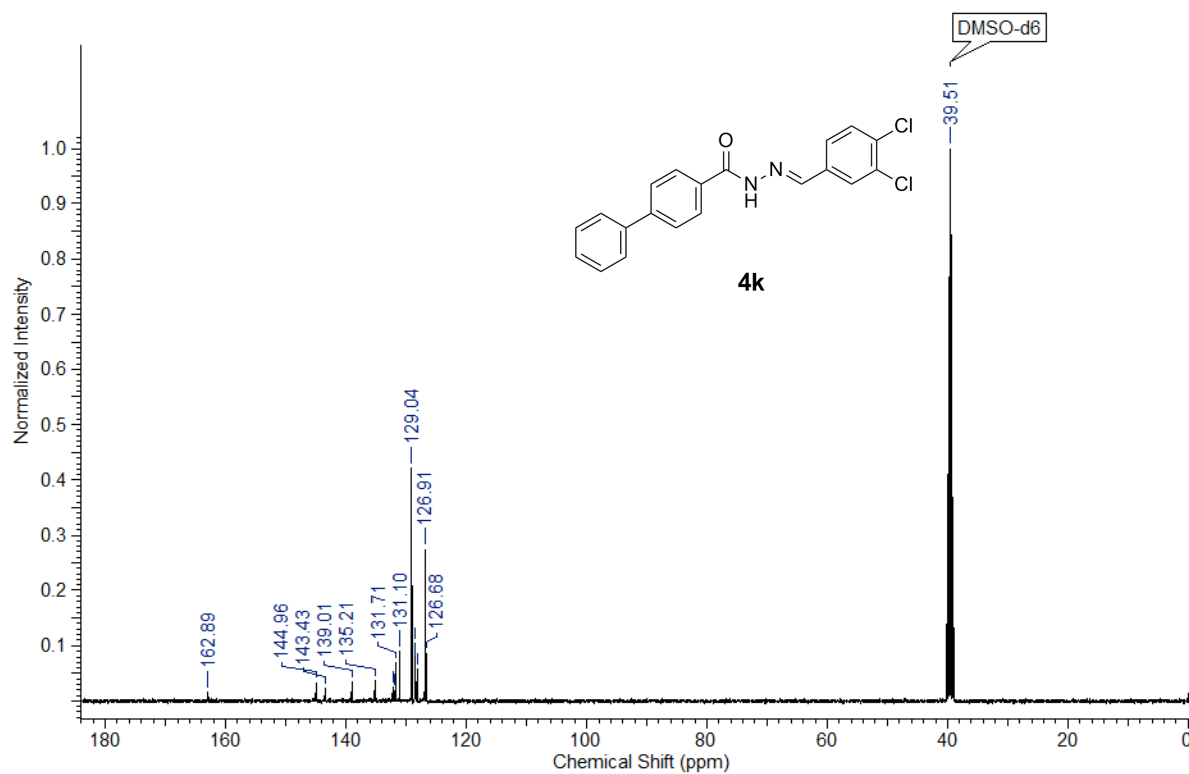


Figura 31. Espectro de NMR de  $^1\text{H}$  do composto **4j**.

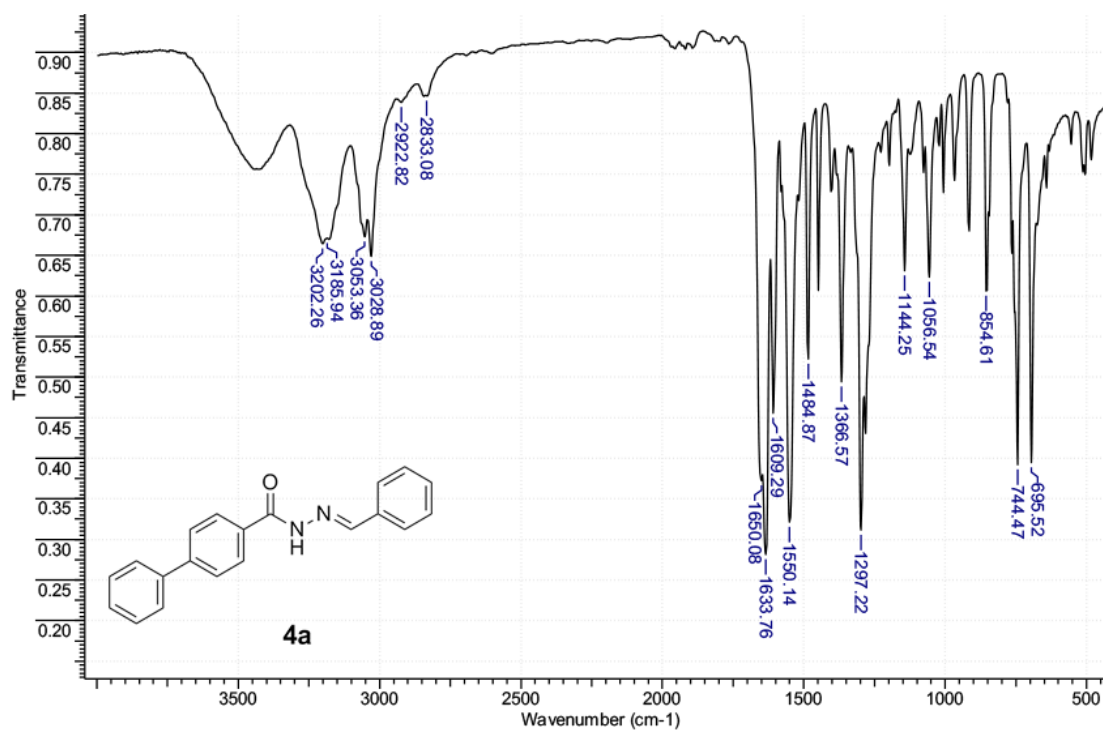


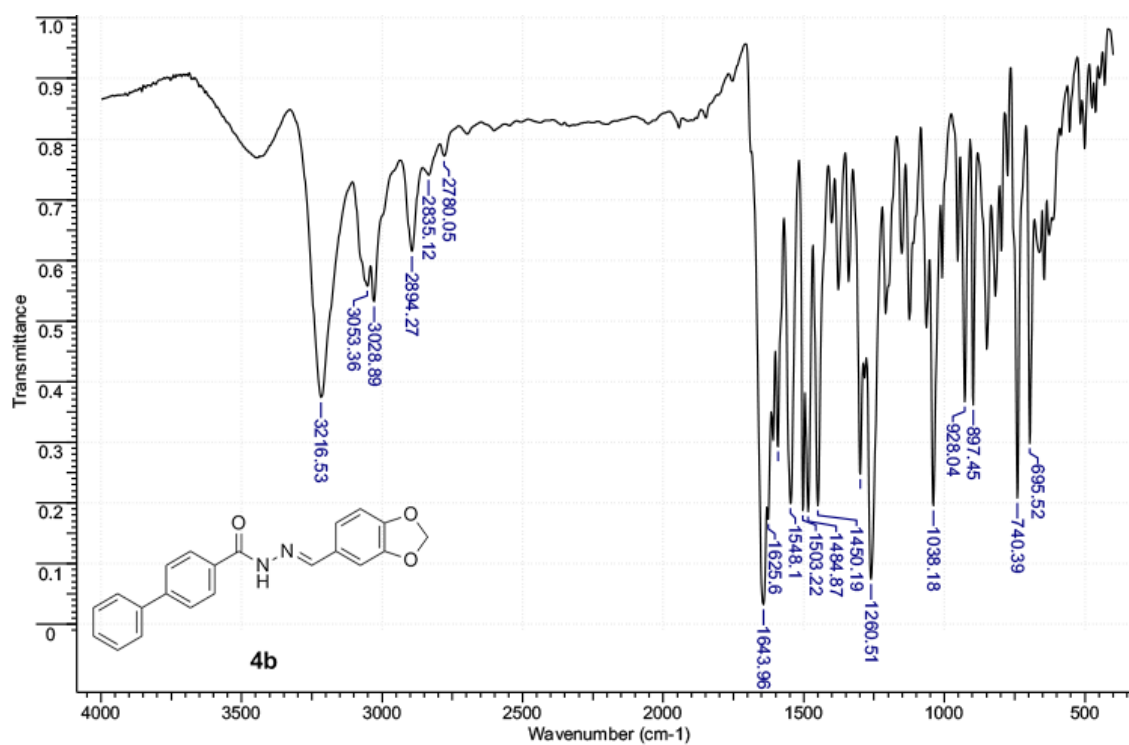
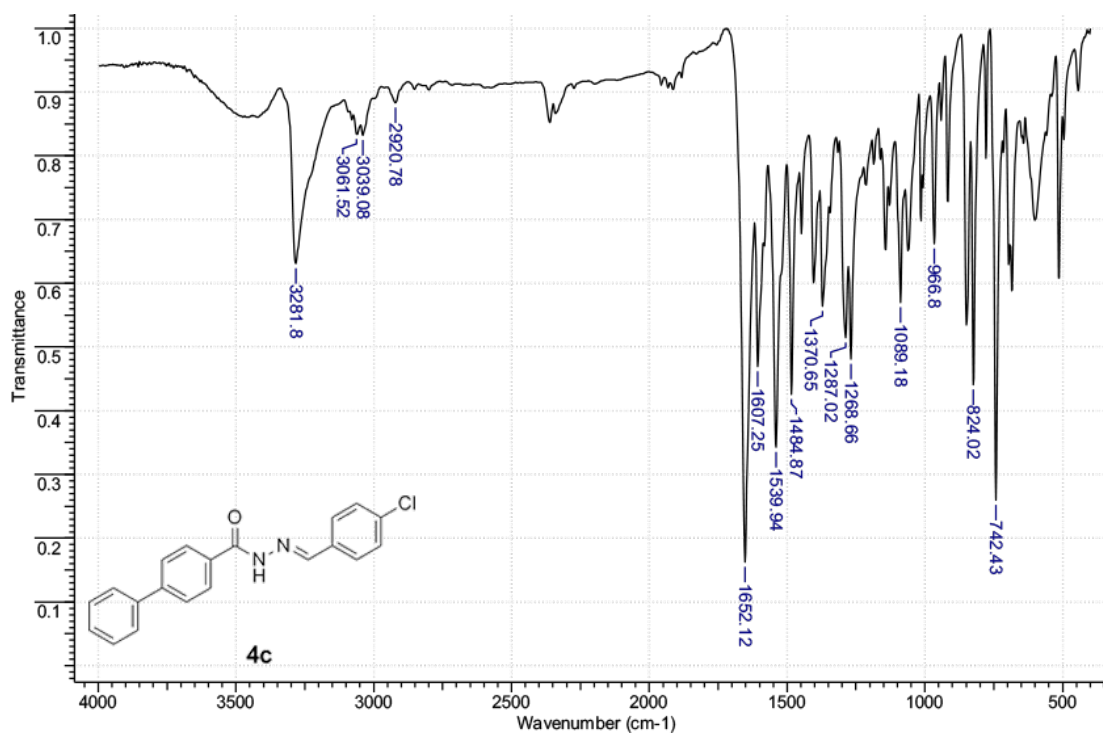


**Figura 34.** Espectro de NMR de  $^{13}\text{C}$  do composto **4k**.



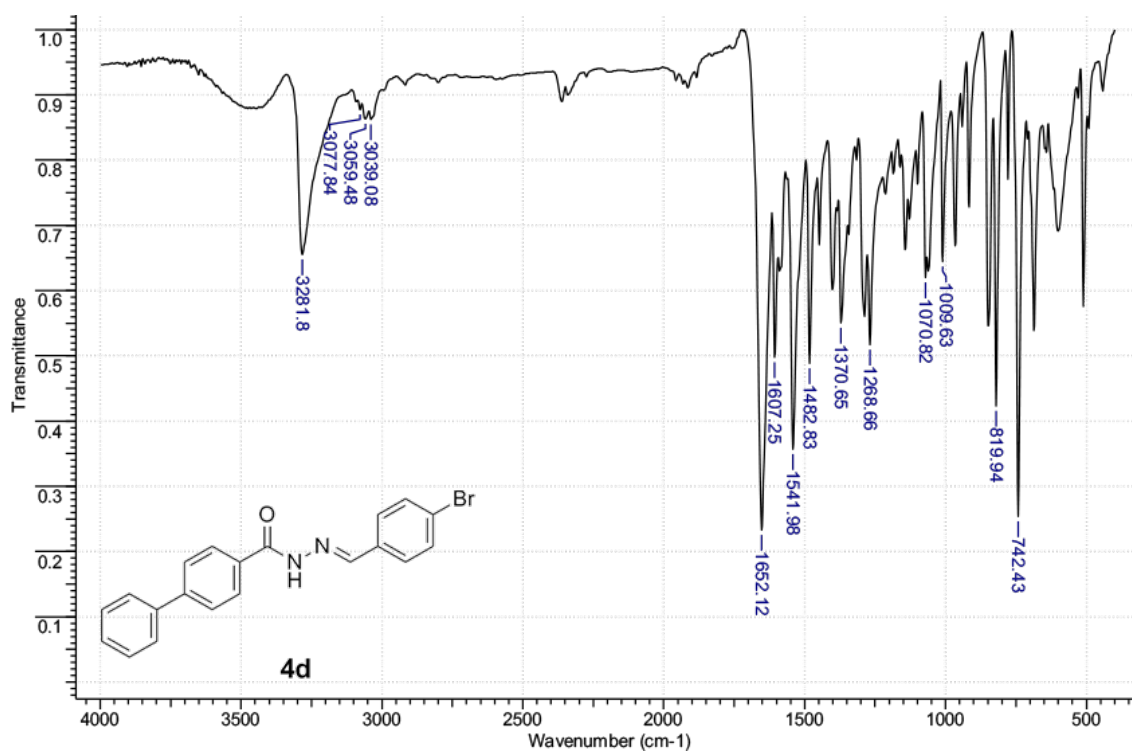
**Figura 35.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4a**.



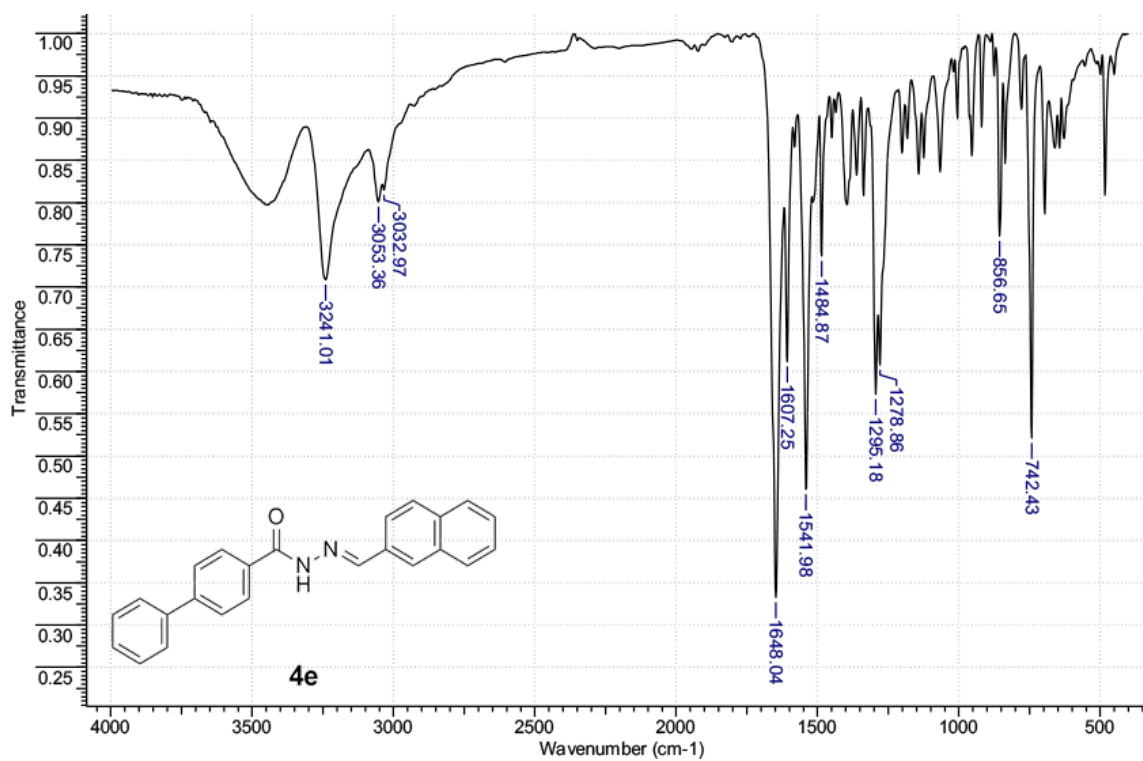
**Figura 36.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4b**.**Figura 37.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4c**.



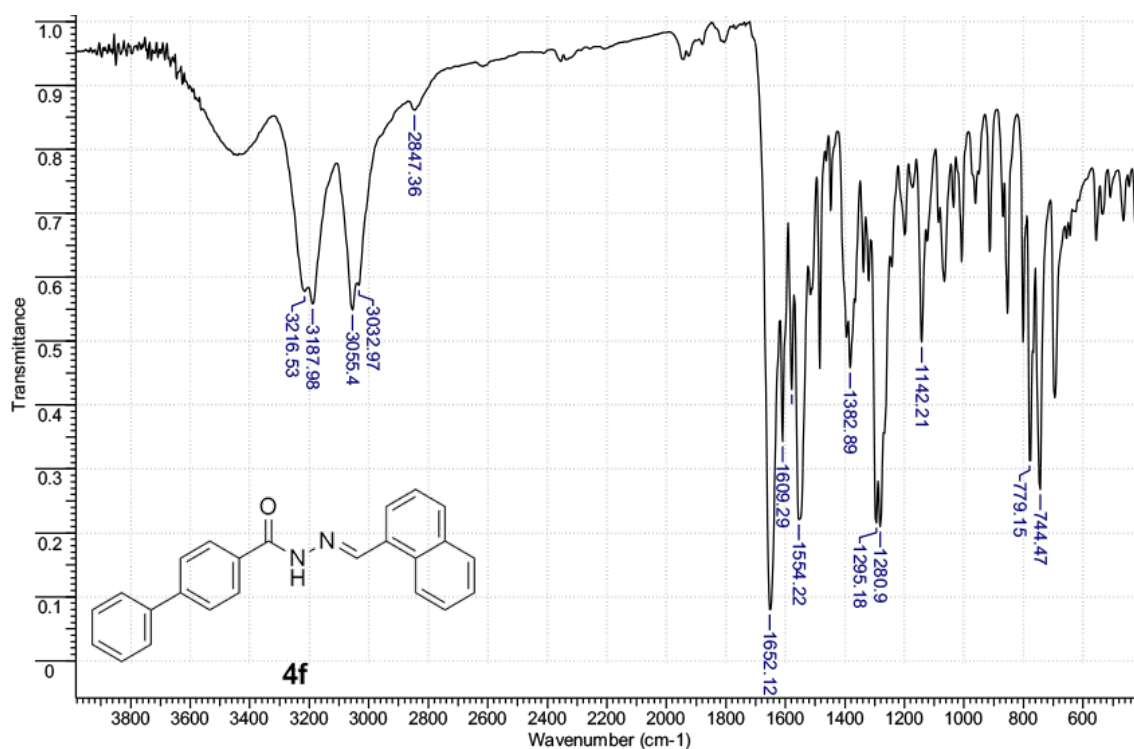
**Figura 38.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4d**.



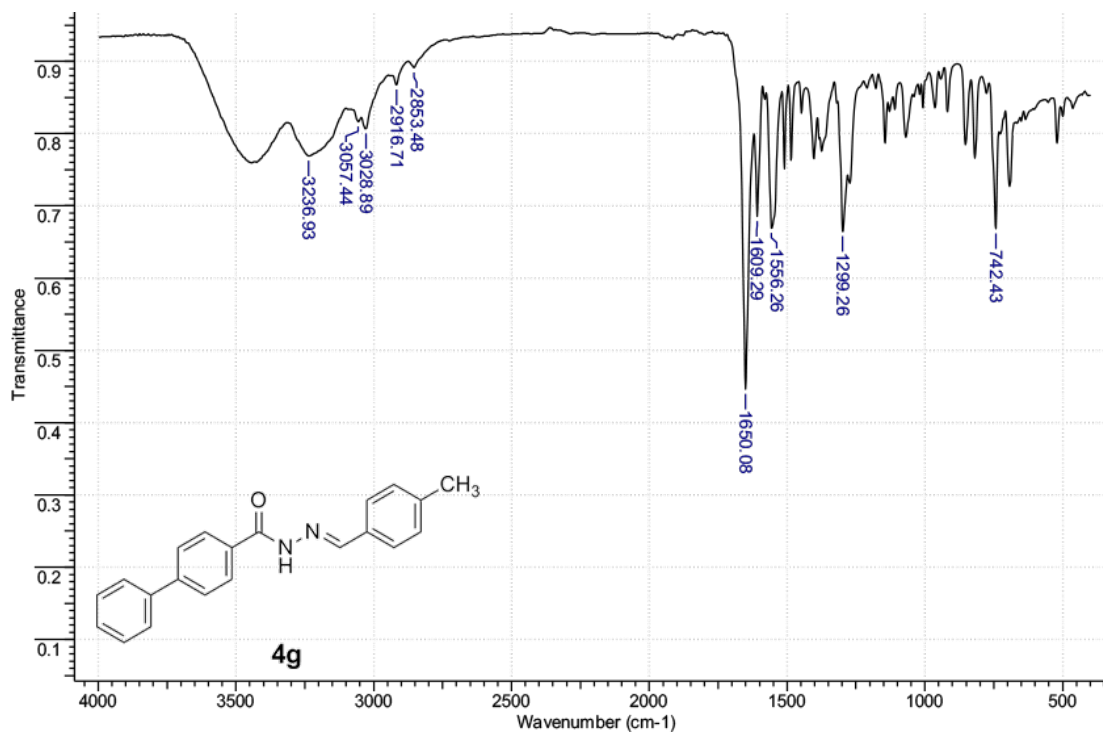
**Figura 39.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4e**.

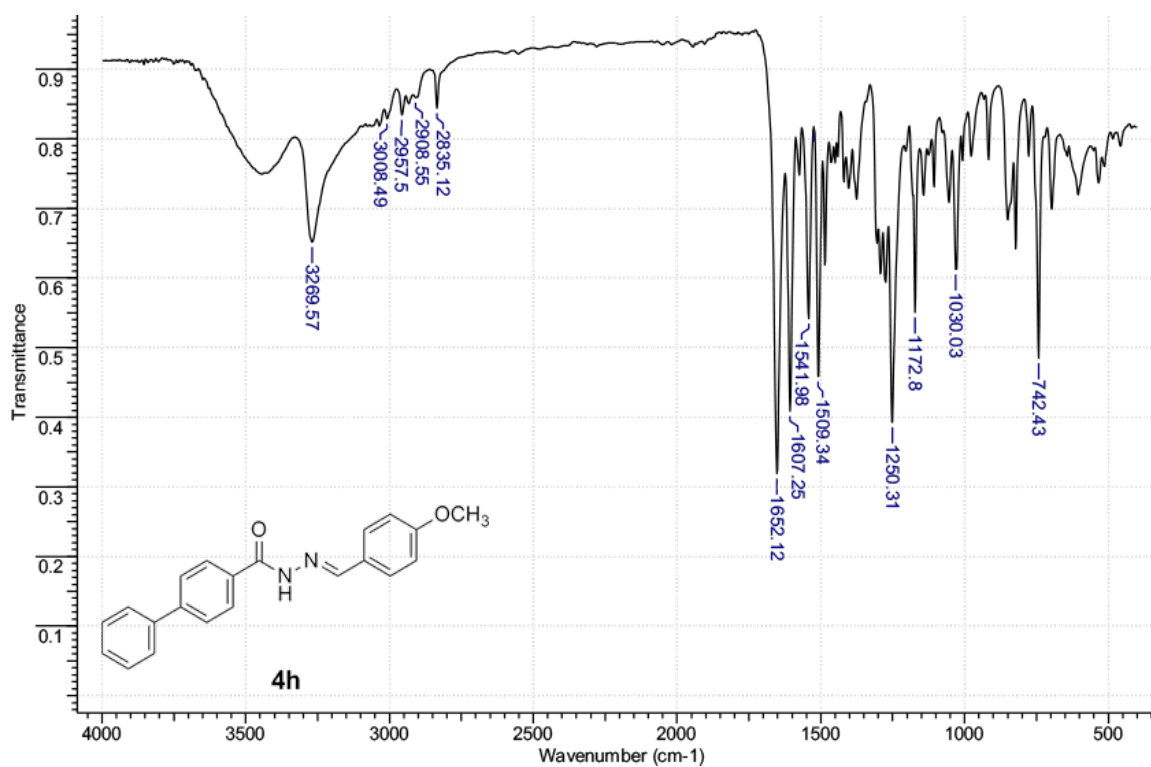
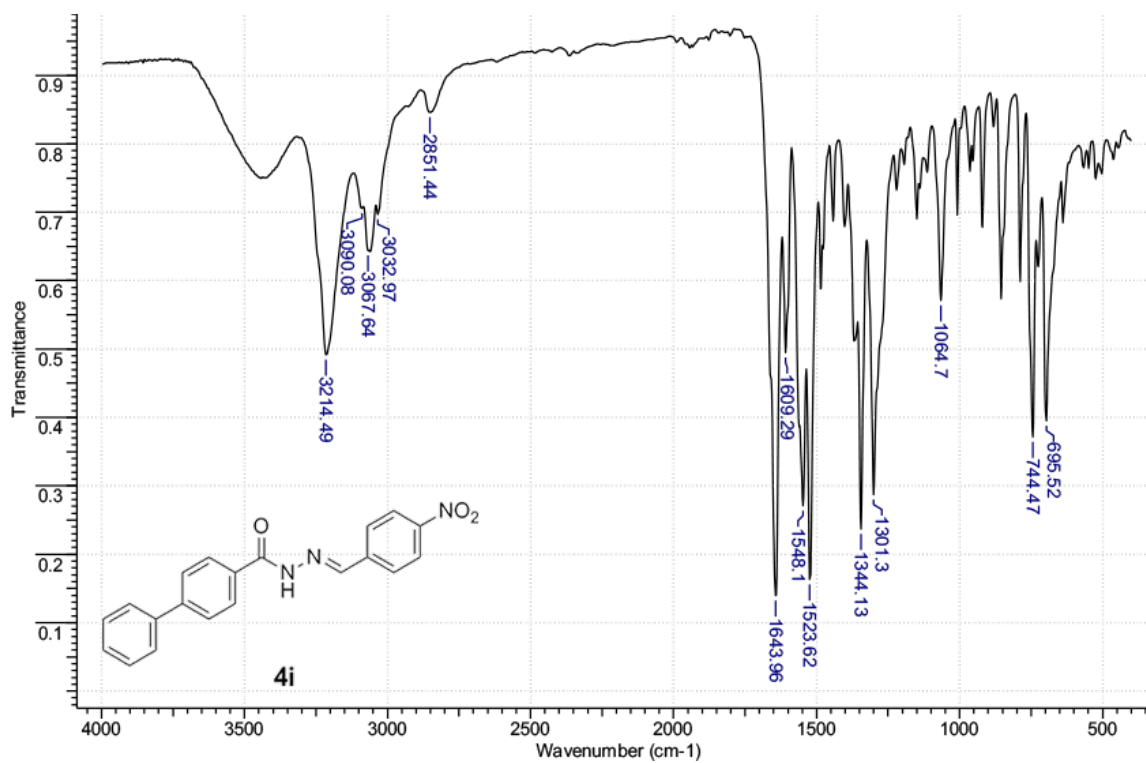


**Figura 40.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4f**.

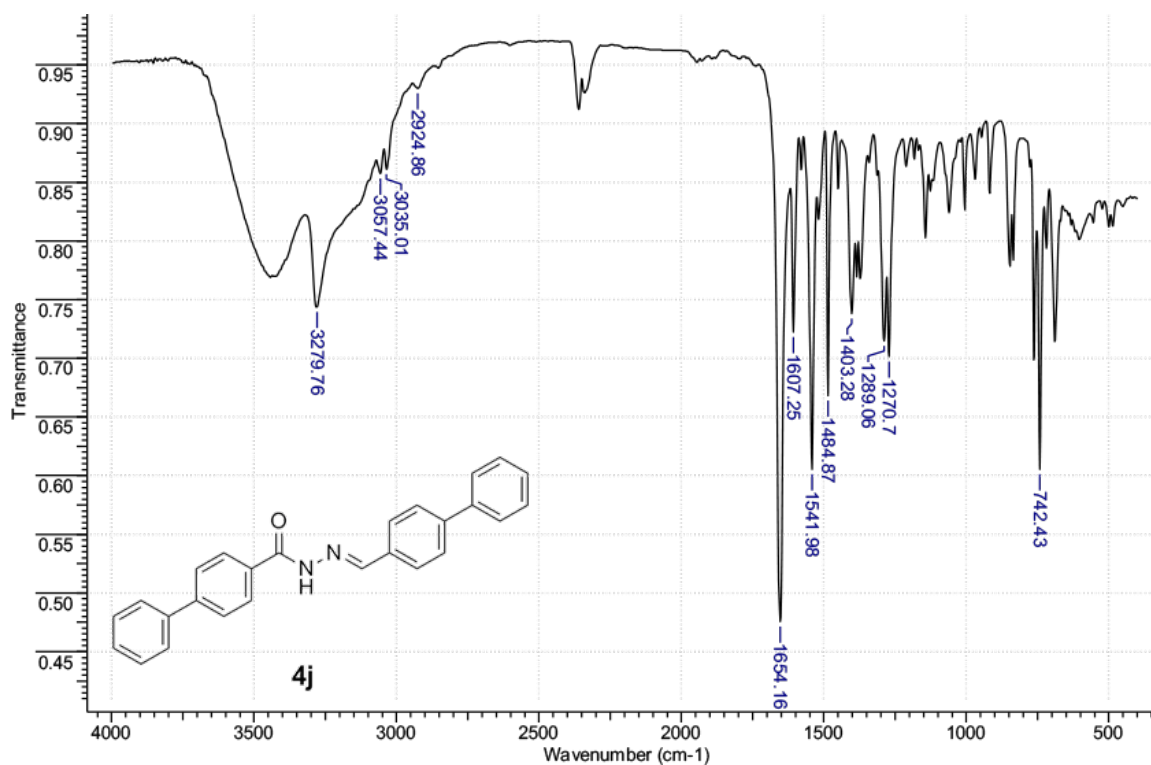


**Figura 41.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4g**.



**Figura 42.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4h**.**Figura 43.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4i**.

**Figura 44.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4j**.



**Figura 45.** Espectro na região do IR em pastilha de KBr do composto **4k**.

